

Université de Sherbrooke

ÉTUDE DU POLYMORPHISME D'EXPRESSION DU GÈNE  
DE LA CASÉINE KAPPA BOVINE CHEZ DES VACHES  
HOLSTEIN HÉTÉROZYGOTES AB PENDANT UNE  
LACTATION COMPLÈTE.

Par

Dominic Vachon

Département d'anatomie et de biologie cellulaire

Mémoire présenté à la faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
maître ès science (M.Sc.)  
en biologie cellulaire

2 Juin 2003



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 0-612-94913-3*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 0-612-94913-3*

The author has granted a non-exclusive license allowing the Library and Archives Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

**Canada**

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes directeurs, Jean Morisset et Denis Petitclerc, pour m'avoir permis de travailler sur ce projet.

Je tiens aussi à remercier Gilles Robitaille pour sa collaboration soutenue lors de mes travaux et de ma rédaction.

Je m'en voudrais de ne pas remercier quelques personnes ayant aussi contribué, de près ou de loin, à la réalisation de cet ouvrage :

Danièle, pour ses nombreux prêts de matériel;

Catherine, pour son esprit critique et son oreille attentive;

Steve, pour son aide indispensable avec les statistiques;

Élaine, pour son amitié et son esprit scientifique;

Jean-François, pour sa constante vision optimiste;

Alexandre, pour son humanité;

Sophie, pour son soutien pendant les derniers milles;

Finalement, je tiens à remercier plus personnellement Danny « Grand Bison » Labrecque, sans qui une grande partie de ce travail n'aurait pas été possible.

## TABLE DES MATIÈRES

	pages
REMERCIEMENTS.....	ii
TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	x
SOMMAIRE.....	1
 <b>CHAPITRE I : INTRODUCTION.....</b>	 <b>3</b>
1.1 L'INDUSTRIE LAITIÈRE CANADIENNE .....	3
1.2 LE LAIT .....	4
1.2.1 Les lipides .....	5
1.2.2 Les minéraux.....	5
1.2.3 Les glucides .....	6
1.3 LES PROTÉINES DU LAIT .....	7
1.3.1 Les protéines du lactosérum.....	7
1.3.1.1 La bêta-lactoglobuline .....	7
1.3.1.2 L'alpha-lactalbumine .....	8
1.3.1.3 L'albumine sérique bovine .....	10
1.3.1.4 Les immunoglobulines.....	10
1.3.2 Les caséines bovines .....	11

1.3.2.1	La caséine alpha S1.....	12
1.3.2.2	La caséine alpha S2.....	14
1.3.2.3	La caséine bêta.....	14
1.3.2.4	La caséine kappa.....	15
1.4	LES MICELLES DE CASÉINE.....	17
1.4.1	Le modèle de Waugh .....	18
1.4.2	Le modèle de Morr.....	19
1.4.3	Le modèle de Slattery et Evard.....	20
1.4.4	Le modèle de la micelle chevelue.....	20
1.5	RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES DES PROTÉINES DU LAIT.....	21
1.5.1	La prolactine .....	22
1.5.2	Les glucocorticoïdes .....	23
1.5.3	L'insuline et l'insulin-like growth factor-1.....	25
1.5.4	La matrice extracellulaire .....	26
1.5.5	L'hormone de croissance.....	27
1.6	LE LOCUS DES CASÉINES .....	28
1.7	LES VARIANTS PROTÉIQUES DES CASÉINES.....	29
1.7.1	Les caséines alpha S1 et alpha S2.....	30
1.7.2	La caséine bêta.....	30
1.7.3	La caséine kappa.....	31
1.8	EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE .....	32
1.9	HYPOTHÈSE DE TRAVAIL.....	34

<b>CHAPITRE II :MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>36</b>
2.1 ANIMAUX UTILISÉS .....	36
2.2 RÉCOLTE DES ÉCHANTILLONS DE LAIT .....	36
2.3 EXTRACTION DE L'ARN DES CELLULES SOMATIQUES DU LAIT .....	36
2.4 HPLC .....	38
2.5 MARQUAGE DES AMORCES ET MESURE DE L'INCORPORATION DE LA .....	
RADIOACTIVITÉ .....	38
2.6 REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION.....	39
2.7 SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM.....	41
2.8 AUTORADIOGRAPHIE .....	42
2.9 DENSITOMÉTRIE.....	42
2.10 ANALYSE STATISTIQUE .....	42
<b>CHAPITRE III : RÉSULTATS.....</b>	<b>45</b>
3.1 QUANTIFICATION DE L'ALLÈLE B AU COURS D'UNE LACTATION.....	45
3.2 IMPACT DE L'EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE ALLÈLE SPÉCIFIQUE DE LA CASÉINE	
KAPPA SUR LA PRODUCTION LAITIÈRE ET LA COMPOSITION DU LAIT .....	52
3.2.1 Lait entier .....	53
3.2.2 Impact sur la composition de la fraction caséine .....	55
3.2.3 Impact sur la composition de la fraction lactosérum .....	58
3.3 INFLUENCE DE L'EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DES ALLÈLES DE LA CASÉINE	
KAPPA, DES VARIANTS GÉNÉTIQUES DE LA $\beta$ -LACTOGLOBULINE ET DE LA CASÉINE	
BÊTA SUR LA PRODUCTION ET LA COMPOSITION DU LAIT PRODUIT SUR PLUSIEURS	
LACTATIONS.....	59

3.3.1	Impact du taux d'expression des allèles.....	59
3.3.2	Influence des variants génétiques de la bêta-lactoglobuline.....	61
3.3.3	Influence des variants génétiques de la caséine bêta .....	62
<b>CHAPITRE IV : DISCUSSION.....</b>		<b>64</b>
4.1	NIVEAU D'EXPRESSION ALLÈLE SPÉCIFIQUE DU GÈNE DE LA CASÉINE KAPPA.....	64
4.2	EFFETS DU STADE DE LACTATION SUR LE POLYMORPHISME D'EXPRESSION DE LA CASÉINE KAPPA .....	66
4.3	IMPACT DES HORMONES SUR L'EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE .....	67
4.4	INFLUENCE DU TAUX D'EXPRESSION DES ALLÈLES SUR LA PRODUCTION, LA COMPOSITION DU LAIT ET LES PROTÉINES DU LACTOSÉRUM.....	70
4.5	LA CASÉINE KAPPA ET LES PROPORTIONS DES CASÉINES .....	71
4.6	IMPACT DE L'EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DES ALLÈLES SUR LA PRODUCTION ET LA COMPOSITION DU LAIT PRODUIT SUR PLUSIEURS LACTATIONS.....	73
4.7	INFLUENCE DU GÉNOTYPE DE LA BÊTA-LACTOGLOBULINE ET DE LA CASÉINE BÊTA SUR LA PRODUCTION ET LA COMPOSITION DU LAIT PENDANT PLUSIEURS LACTATIONS.....	74
<b>CHAPITRE V : CONCLUSIONS.....</b>		<b>77</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>		<b>80</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

$\alpha$	: Alpha
$\beta$	: Bêta
$\gamma$	: Gamma
$\kappa$	: Kappa
$\mu$	: Micro ( $10^{-6}$ )
BSA	: Bovine serum albumin
CN	: Caséine
°C	: Degré Celsius
Da	: Daltons
g	: Gramme
GAS	: Gamma-interferon activation site
GH	: Growth hormone
GR	: Glucocorticoid receptor
GRE	: Glucocorticoid response element
HSP	: Heat shock protein
Ig	: Immunoglobuline
IGF-1	: Insulin-like growth factor-1
IGFBP	: IGF binding protein
IL-6	: Interleukine 6
JAK2	: Protéine tyrosine kinase Janus de type 2
kb	: Kilo base
kg	: Kilogramme
LINE	: Long interspersed element



MEC : Matrice extracellulaire

Met : Méthionine

ml : Millilitre

nm : Nanomètre

<sup>32</sup>P : Isotope 32 du phosphore

PATLQ : Programme d'Analyse des Troupeaux Laitiers du Québec

pb : Paires de bases

PCR : Polymerase chain reaction

Phe : Phénylalanine

PRL : Prolactine

PRLR : Récepteur de la prolactine

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction

Stat5 : Signal transducer and activator of transcription 5

SNPs : Polymorphismes de nucléotide simple

SSCP : Single strand conformation polymorphism

TFA : Acide trifluoroacétique

TNF : Tumor necrosis factor

YAC :Yeast artificial chromosome

## LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1	Gènes de la $\beta$ -lactoglobuline et de l' $\alpha$ -lactalbumine bovines..... 10
Figure 2	Structure des gènes des caséines $\alpha$ S1, $\alpha$ S2, $\beta$ et $\kappa$ ..... 13
Figure 3	Séquence primaire de la caséine $\kappa$ ..... 16
Figure 4	Modèle de la micelle «chevelue»..... 21
Figure 5	Représentation du locus des caséines chez l'humain, la souris et le bovin..... 29
Figure 6	Autoradiographie découlant de l'analyse par SSCP des produits obtenus par RT-PCR SSCP..... 46
Figure 7	Proportion relative d'ARNm provenant de l'allèle B de la CN- $\kappa$ à différents stades de lactation pour la vache # 5103 (groupe 1)..... 50
Figure 8	Proportion relative d'ARNm provenant de l'allèle B de la CN- $\kappa$ à différents stades de lactation pour la vache # 537 (groupe2)..... 50
Figure 9	Variation de l'expression de l'allèle B du gène de la caséine kappa au cours d'une lactation chez des individus du groupe 1..... 51
Figure 10	Variation de l'expression de l'allèle B du gène de la caséine kappa au cours d'une lactation chez les individus du groupe 2 ..... 51
Figure 11	Profil de HPLC typique pour les caséines du lait bovin selon la méthode de Visser et al., (1991)..... 56

## LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1      Position des acides aminés des différents variants génétiques de la caséine kappa.....	32
Tableau 2      Moyenne de l'expression de l'allèle B au cours d'une lactation pour les individus du groupe 1 montrant un taux d'expression équivalent des allèles A et B pour la caséine kappa.....	47
Tableau 3      Moyenne de l'expression de l'allèle B au cours d'une lactation pour les individus du groupe 2 montrant un taux d'expression différents des allèles A et B pour la caséine kappa.....	48
Tableau 4      Répartition des échantillons de lait recueillis en fonction du stade de lactation et du jour de test.....	52
Tableau 5      Effets de l'expression différentielle sur les variables de production et de composition du lait au cours de la lactation.....	54
Tableau 6      Proportions moyennes des caséines obtenues à partir des échantillons de lait de toutes les vaches faisant partie de l'étude.	57
Tableau 7      Proportions moyennes de la lactoglobuline et le l' $\alpha$ -lactalbumine obtenues à partir des échantillons de lait de toutes les vaches faisant partie de l'étude.....	58
Tableau 8      Influence de l'expression différentielle des allèles sur la production laitière moyenne des vaches faisant partie de l'étude lors de leurs trois premières lactations.....	60
Tableau 9      Influence du génotype de la $\beta$ -lactoglobuline sur la production laitière moyenne des vaches faisant partie de l'étude lors de leurs trois premières lactations.....	61
Tableau 10     Influence du génotype de la caséine $\beta$ sur la production laitière moyenne des vaches faisant partie de l'étude lors de leurs trois premières lactations.....	63

## SOMMAIRE

Le présent travail porte sur l'étude d'un polymorphisme d'expression du gène de la caséine kappa (CN- $\kappa$ ) chez certaines vaches de race Holstein hétérozygotes AB pour ce gène. Lors d'études effectuées dans notre laboratoire, nous avons identifié des vaches pour lesquelles l'allèle B était transcrit en ARNm avec une plus grande efficacité que l'allèle A (Robitaille et Petitclerc, 2000). L'objectif de notre étude fut donc de tester l'effet du stade de lactation sur ce polymorphisme d'expression.

Des vaches de race Holstein hétérozygotes AB pour le gène de la CN- $\kappa$  (n=30) ont été analysées en fonction de la proportion relative des transcrits spécifiques CN- $\kappa$  A et B dans les mammocytes et ce, pendant toute une lactation. Les échantillons de lait ont été prélevés de chacune des vaches à différents stades de lactation (4 à 8 jours de test/vache) et les cellules somatiques ont été récoltées par centrifugation. Les cellules ont été lysées avec le réactif Trizol<sup>®</sup> et l'ARN total a été préparé selon un protocole standard. La proportion relative des ARNm spécifiques de chaque allèle a été déterminée par densitométrie suivant une combinaison de réaction de polymérisation en chaîne reverse (RT-PCR) puis de séparation par conformation simple brin (SSCP). Le changement dans la proportion relative des ARNms en fonction du stade de lactation a été analysé avec la procédure Proc Mix du logiciel SAS. Suite à cette étude, nous avons identifié 2 populations distinctes d'animaux : des vaches démontrant une expression équivalente des 2 allèles du gène de la CN- $\kappa$  (groupe 1) (n=9) et des vaches démontrant une expression différentielle des 2 allèles (groupe 2) (n=21). Le polymorphisme d'expression est maintenu tout au cours de la lactation chez les vaches du groupe 2 et la moyenne de la

proportion relative d'ARNms spécifiques à l'allèle B était de  $53,95 \pm 0,89\%$ ; cette proportion n'a pas été affectée de façon significative par le stade de lactation ( $P > 0,25$ ). Les vaches du groupe 1 ont conservé un phénotype d'expression équivalent pour les 2 allèles tout au long de la lactation avec une proportion relative de  $50,64 \pm 0,51\%$ . Une meilleure compréhension du mécanisme impliqué dans l'expression différentielle de la CN- $\kappa$  devrait éventuellement en permettre l'usage comme marqueur efficace de sélection génétique.

## **CHAPITRE I**

### **1 Introduction**

La composition et les qualités nutritives du lait en font un aliment presque complet. Si aucun aliment ne peut combler tous les besoins nutritionnels de l'être humain et assurer à lui seul le bon fonctionnement de l'organisme, le lait est toutefois l'aliment qui se rapproche le plus de cet idéal. Sa composition varie selon chaque espèce mais les diverses composantes restent sensiblement les mêmes. L'eau reste toujours le constituant majeur du lait mais on y retrouve des protéines, des lipides, des glucides, des sels, des minéraux et des vitamines en concentrations diverses. Les protéines du lait sont parmi les protéines alimentaires les plus étudiées. Elles constituent aussi un sujet de recherche intensive depuis de nombreuses années. Parmi ces protéines, les caséines, ainsi que leur structure d'assemblage caractéristique que constitue la micelle, ont été particulièrement étudiées. Ces dernières sont responsables d'une grande partie des propriétés physico-chimiques du lait.

#### **1.1 L'industrie laitière canadienne**

En 2000-2001, l'industrie laitière canadienne a généré des revenus nets de plus de 4 milliards de dollars; cette somme représentait plus de 14,1 % des revenus agricoles canadiens. Cette industrie se classe en troisième position derrière la production de viandes de boucherie et des grains et oléagineux. La production totale de lait avoisinait les 78,1 millions d'hectolitres, toujours pour l'année 2000. Cette production était répartie dans 2 marchés : celui du lait de consommation et celui du lait de transformation. Le

marché du lait de consommation compte pour 40% de la production laitière et celui de la transformation pour les 60% restants, soit pour 47,1 millions d'hectolitres de lait. Au cours de la dernière décennie, une augmentation marquée du rendement laitier des vaches canadiennes a été observée; selon les données de la commission canadienne du lait en 1990, une vache laitière produisait en moyenne 7412 kgs de lait comparativement à 9152 kgs pour une vache moyenne en 2000. Cette augmentation de 19% est le résultat de recherches dans plusieurs domaines connexes tels la génétique bovine, l'alimentation de la vache laitière et l'amélioration de l'environnement immédiat des animaux. Malgré de faibles exportations de produits laitiers au niveau mondial (moins de 2 % du volume total des produits laitiers échangés sur le marché international sont canadiens), le Canada est un fournisseur reconnu de matériel génétique pour le bovin laitier. Toujours selon la Commission canadienne du lait, la part du marché mondial des bovins, des embryons et de la semence s'établit à plus de 20%.

## **1.2 Le lait**

Le lait est caractéristique à chaque espèce de mammifères et sa fonction première est de nourrir les nouveau-nés. Tous les laits contiennent des protéines spécifiques, des lipides facilement digestibles, la plupart contiennent du lactose, des minéraux, des vitamines, et plusieurs autres composantes pouvant avoir des rôles importants. Ces composantes sont organisées comme suit : des lipides émulsifiés sous forme globulaire, des protéines dispersées sous forme colloïdale comme les micelles, et la plupart des minéraux ainsi que tout le lactose en solution (Jensen et al., 1991). La composition usuelle du lait bovin est de 3,7 % de matières grasses, 3,4 % de protéines, 4,8 % de glucides, 0,7% de minéraux et près de 87 % d'eau (Jenness, 1988). Qu'il soit utilisé pour

fabriquer du fromage, de la crème glacée ou du yogourt par exemple, certains de ces éléments sont privilégiés, soit les protéines pour le fromage, et les matières grasses pour le beurre.

### **1.2.1 Les lipides**

Le lait bovin contient plusieurs types de lipides dont les principaux sont les triglycérides. Ces derniers constituent presque l'exclusivité du gras du lait puisqu'ils représentent en moyenne de 96 à 98% des lipides (Jensen, 1995). Chez les ruminants, on retrouve des acides gras à chaînes courtes en grande proportion; ils proviennent de la fermentation anaérobie de glucides comme la cellulose par les microorganismes présents dans le système digestif de ces animaux. On retrouve aussi des mono et des diglycérides ainsi que des phospholipides mais en beaucoup plus faible quantité (0.02 et 0.04 g/100ml de lait, respectivement) (Jensen, 1995).

### **1.2.2 Les minéraux**

Le lait bovin ou humain fournit de nombreux minéraux. On retrouve, par contre, quatre fois plus de minéraux dans le lait bovin que dans le lait humain. Les principaux sont le calcium, le potassium et le phosphore (0,125 g/100 ml; 0,138g/100 ml et 0,096 g/100 ml respectivement pour le lait bovin; 0,033 g/100 ml; 0,055 g/100 ml et 0,015 g/100 ml pour le lait humain). Les différences de concentrations observables entre le lait bovin et humain sont en grande partie explicables par le fait que le lait bovin contient beaucoup plus de caséines. En effet, c'est le calcium et le phosphore qui permettent l'auto- assemblage des micelles de caséine. Comme le lait bovin contient 13 fois plus de



caséines que le lait humain, il est normal qu'il contienne aussi plus de calcium et de phosphore. On retrouve en plus du citrate dans le lait bovin (0,16 g/100 ml de lait). La présence de cette substance est due à l'absence de l'enzyme citrate lyase dans les cellules épithéliales mammaires bovines. Cet enzyme permet de transformer le citrate issu du cycle de Krebs en acétyl-CoA. Conséquemment, le lait humain ne contient pas de citrate car les cellules épithéliales mammaires humaines possèdent cet enzyme. D'autres minéraux sont aussi présents dans le lait mais en plus petite quantité; on y retrouve du sodium, du magnésium et du chlore (0,058 g/100 ml; 0,012 g/100 ml et 0,103 g/100 ml respectivement chez la vache et 0,015 g/100 ml; 0,004 g/100 ml et 0,043 g/100 ml chez l'humain) (Jensen, 1995).

### **1.2.3 Les glucides**

On retrouve de nombreux glucides présents dans le lait dont le lactose est le sucre principal. Il constitue à lui seul 95,8% des sucres présents dans le lait de vache (4,6 g/100 ml). Toujours dans le lait de vache, on retrouve des oligo et des monosaccharides (0,1 et 0,02 g/100 ml de lait). Il existe une autre différence notoire entre la quantité de glucides présents dans le lait bovin et humain (4,8 g/100 ml dans le lait de vache contre 7,0 g/100 ml dans le lait humain) (Jensen, 1995). Cette différence est due à une plus grande expression de l'alpha lactalbumine dans les cellules épithéliales mammaires humaines. Cette molécule intervient dans la synthèse du lactose. Comme ce sucre est trop gros pour traverser la membrane de l'appareil de Golgi, il s'accumule et crée un appel d'eau intracellulaire pour maintenir l'équilibre osmotique. Comme le lactose est le principal sucre du lait de la plupart des mammifères, ce processus est considéré comme étant celui générant la majeure partie de la phase aqueuse du lait (Brew et Grobler, 1992).

### **1.3 Les protéines du lait**

La contribution des protéines du lait au niveau de la nutrition humaine peut être appréciée quand on sait que sur une base *per capita*, environ 25% de l'apport quotidien en protéines dans la diète d'un Américain moyen provient des produits laitiers. Les protéines du lait sont habituellement séparées en deux groupes distincts : les protéines du lactosérum et les caséines. Le lait comporte aussi plusieurs autres protéines d'importance mineure quant à leur quantité. Certaines d'entre elles possèdent par contre des activités biologiques intéressantes telle la lactoferrine, protéine qui présente des activités antibactérienne, anti-fongique et anti-virale (Van Berckel et al., 2002).

#### **1.3.1 Les protéines du lactosérum**

Le lactosérum constitue la portion du lait restante après précipitation des caséines à pH 4,6 et le retrait des lipides. Les protéines du lactosérum sont de forme globulaire et beaucoup plus solubles que les caséines. Elles sont aussi sujettes à la dénaturation par la chaleur. Les fractions protéiques principales sont la  $\beta$ -lactoglobuline, l' $\alpha$ -lactalbumine, l'albumine sérique et les immunoglobulines. Il est important de noter que l'albumine sérique et les immunoglobulines ne sont pas produites dans les cellules épithéliales mammaires mais plutôt dans le sang.

##### **1.3.1.1 La bêta-lactoglobuline**

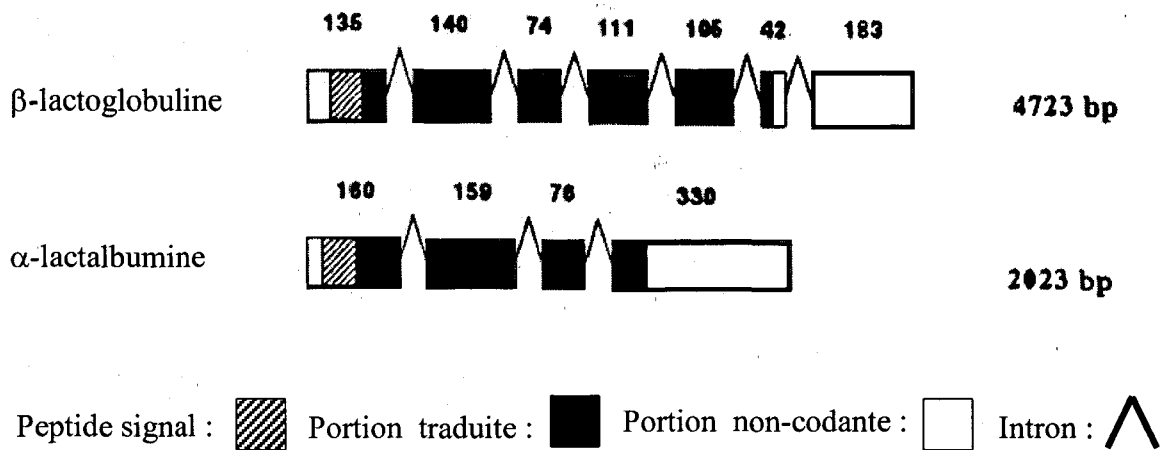
La  $\beta$ -lactoglobuline est la protéine majeure du lactosérum et elle constitue 50-60% des protéines solubles. C'est une protéine de 18 300 Daltons (Da), codée par un gène comportant relativement peu d'exons et d'une taille d'environ 4720 paires de bases (pb)

(voir Figure 1). Elle est présente dans le lait sous forme de dimères. Le monomère de  $\beta$ -lactoglobuline est constitué d'un peptide de 162 acides aminés contenant cinq cystéines, dont quatre sont impliquées dans des ponts disulfure entre 2 monomères (Pérez et Calvo, 1995). La conformation de la protéine est dépendante du pH et, comme toutes les autres protéines du lactosérum, elle est labile; c'est-à-dire sensible à la chaleur. À des pH inférieurs à 3, le dimère se dissocie pour préserver la conformation native de la protéine (Taulier et Chalikian, 2001). La fonction biologique de la  $\beta$ -lactoglobuline a été un sujet de spéculation au cours des dernières années. Cependant, aucune fonction spécifique n'a été confirmée jusqu'à présent. Comme cette protéine se lie au rétinol et qu'elle présente une homologie au niveau de sa séquence primaire avec des transporteurs de la vitamine A, on a émis l'hypothèse que la  $\beta$ -lactoglobuline jouerait un rôle dans le transport du rétinol (Reddy et al., 1992). De plus, le fait que cette protéine augmente l'incorporation d'acides gras dans le hépatocytes suggère qu'elle pourrait jouer un rôle dans le métabolisme des acides gras chez le nouveau-né (Burczynski et al., 1990). Le génotype de la  $\beta$ -lactoglobuline a une influence sur la proportion de caséines dans le lait bovin. La présence de l'allèle B de cette protéine est associée à une plus grande proportion de caséines par rapport aux protéines totales et à une plus grande quantité de caséine dans le lait (Lundén et al., 1997; Robitaille et al., 2002). Son génotype affecte donc grandement la composition du lait.

#### **1.3.1.2 L'alpha-lactalbumine**

L' $\alpha$ -lactalbumine est une sous-unité de la lactose synthase, enzyme catalysant la synthèse du lactose à partir d'une molécule de glucose et de galactose. La lactose synthase est composée de 2 sous-unités. La première est la galactosyl transférase : c'est

une sous-unité non spécifique possédant l'activité catalytique de l'enzyme; elle se retrouve aussi dans d'autres tissus que la glande mammaire et elle est fixée à la paroi interne de l'appareil de Golgi. L' $\alpha$ -lactalbumine constitue la sous-unité régulatrice de la lactose synthase : sa fonction est de promouvoir la liaison du glucose avec la galactosyl transférase, réduisant ainsi le  $K_m$  de la réaction jusqu'à 1000 fois (Brew et Grobler, 1992). Cette protéine présente aussi des analogies de structure avec le lysozyme (qui lyse la paroi bactérienne en attaquant la partie polyosidique des peptidoglycannes) : poids moléculaire voisin, des acides aminés terminaux identiques et la présence de 4 ponts disulfure (Xue et al., 2001; Permyakov et Berliner, 2000). Cependant, certaines divergences (acide glutamique 32 de l' $\alpha$ -lactalbumine remplacé par l'histidine 35 dans le lysozyme) expliquent que l' $\alpha$ -lactalbumine ne possède pas l'activité hydrolytique du lysozyme. C'est une protéine de 14 146 Da qui est codée par un gène de 2023 pb. Comme dans le cas de la  $\beta$ -lactoglobuline, le gène codant pour l' $\alpha$ -lactalbumine n'est pas d'une grande complexité (voir Figure 1).



**Figure 1.** Gènes de la  $\beta$ -lactoglobuline et de l' $\alpha$ -lactalbumine bovine. La taille des gènes est indiquée à droite et la taille de chaque exon est indiquée au-dessus de ces derniers. La longueur des introns n'est pas indiquée. Adapté de Mercier et Vilotte (1993).

### 1.3.1.3 L'albumine sérique bovine

L'albumine sérique bovine (BSA) est une protéine d'environ 66 000 Da. Elle a été très bien caractérisée et les propriétés physico-chimiques de cette protéine sont bien connues (Feldhoff et Peters, 1975). Très peu d'attention a été accordée au rôle de la BSA dans le lactosérum. Elle représente à peine 5% du contenu en protéines de ce dernier. Sa fonction biologique première a été associée à sa facilité à se lier aux lipides (Fox et Flynn, 1992) par un mécanisme non élucidé jusqu'à présent.

### 1.3.1.4 Les immunoglobulines

Les immunoglobulines sont des protéines plasmatiques, des anticorps, dont la fonction est de reconnaître spécifiquement des macromolécules étrangères à l'organisme apportées principalement par l'alimentation, la respiration ou par les invasions

microbiennes ou virales, et les préparent à être capturés ou détruits par les phagocytes (Janeway et Travers, 1997). Présentes dans le lait surtout en début de lactation, elles constituent une immunisation passive pour le nouveau-né. Les immunoglobulines sont composées de plusieurs types de sous-unités de masses moléculaires différentes (chaînes lourdes et chaînes légères), provenant de gènes structuraux susceptibles de combinaisons et de remaniements variables. L'extrémité commune des chaînes lourdes et des chaînes légères est très variable en structure primaire et adaptée à la reconnaissance spécifique d'un antigène; les sites impliqués dans cette reconnaissance sont qualifiés de régions hypervariables. La partie constante de la structure des immunoglobulines est responsable de leurs fonctions effectrices : fixation du complément, lyse antibactérienne, activité antivirale. Les immunoglobulines se distinguent en plusieurs types dont IgG1, IgG2, IgA et IgM sont les 4 types que l'on retrouve dans le lait. Elles se différencient principalement par leur masse moléculaire et les types de chaînes lourdes qu'elles contiennent.

### **1.3.2 Les caséines bovines**

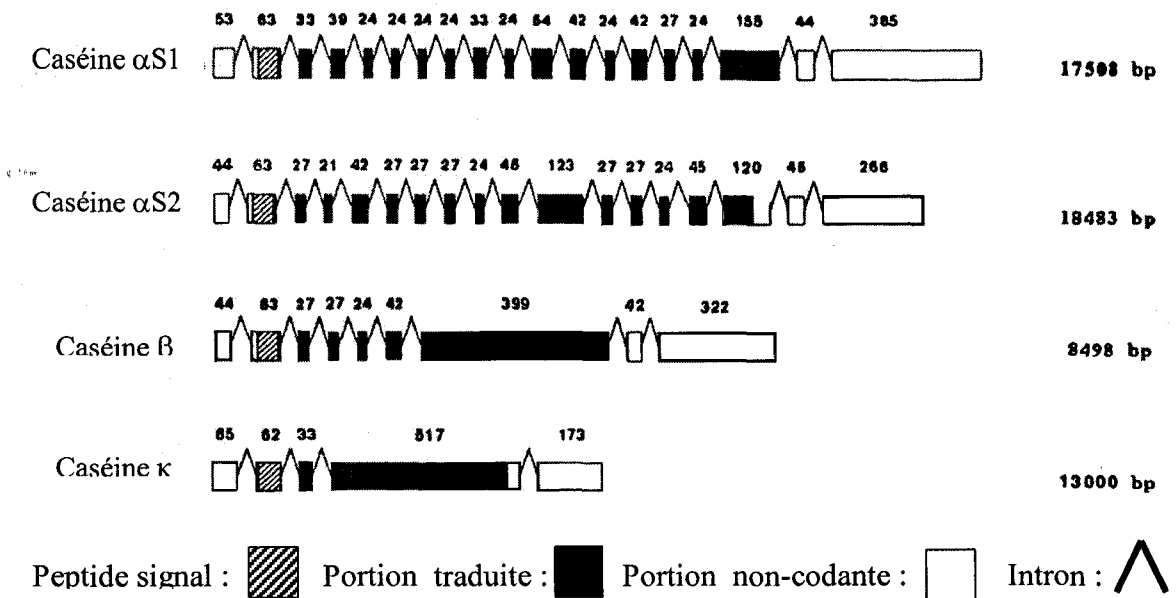
Les caséines représentent la fraction protéique majeure dans le lait de la plupart des espèces (Alexander et al., 1988). Elles constituent une famille de phosphoprotéines synthétisées dans la glande mammaire en réponse à des hormones lactogéniques et à d'autres stimuli. Chaque caséine est formée d'une seule chaîne peptidique. Ces caséines sont sécrétées sous forme de gros colloïdes appelés micelles, responsables de plusieurs des propriétés physiques uniques du lait (Ginger et Grigor, 1999). Elles permettent, entre autres, d'augmenter la concentration de calcium et de phosphate dans le lait à des niveaux qui excèdent de beaucoup la solubilité du phosphate de calcium. Conséquemment, la formation des os chez les jeunes animaux dépend de la capacité des caséines à transporter

des quantités appropriées de phosphate de calcium dans le lait. Les caséines sont séparées en deux groupes distincts : les caséines sensibles au calcium et celles insensibles au calcium. Une caséine est classée sensible au calcium si elle précipite en présence de cet ion. Les caséines  $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2 et  $\beta$  sont dites sensibles au calcium tandis que la CN- $\kappa$  y est insensible. Les caséines sensibles au calcium semblent avoir évolué à partir du même gène ancestral. Gaye et ses collaborateurs (1977) ont proposé la théorie du gène ancestral à partir de la découverte de motifs communs dans la séquence des régions 5' proximales des gènes des caséines  $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2 et  $\beta$ . L'observation de l'organisation similaire des quatre premiers exons des caséines susmentionnées a mené Jones et al. (1985) à proposer un modèle plus élaboré. Les caséines  $\alpha$ S1,  $\alpha$  2 et  $\beta$  seraient dérivées d'un gène primitif composé de quelques exons : un exon correspondrait à la région 5' non transcrite, les autres coderaient pour le peptide signal, un site de phosphorylation et un peptide hydrophobe. Ce gène aurait subi des duplications intra et intergéniques avec des gènes d'origine évolutive différente (des gènes n'ayant donc pas évolué à partir d'un même gène ancestral) pour mener à la conformation actuelle des gènes des caséines  $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2 et  $\beta$ .

#### **1.3.2.1 La caséine alpha S1**

La caséine  $\alpha$ S1 est une protéine de 199 acides aminés comprenant 8 groupes phosphates estérifiés à des sérines. Cette molécule a un poids moléculaire de 23,6 kDa. Un segment de la protéine (acides aminés 45-89) est hautement chargé car il porte tous les groupements phosphates. La protéine native précipite dès que 8 ions  $\text{Ca}^{2+}$  lui sont liés. La liaison du calcium réduit la charge de la molécule et la charge résiduelle n'est apparemment pas suffisante pour empêcher l'agrégation. Des études récentes ont démontré que la liaison de  $\text{Ca}^{2+}$  à la caséine  $\alpha$ S1 causait un changement de conformation

dans la protéine; ce phénomène amène des groupes plus hydrophobes en contact avec le solvant (Jensen, 1995). Contrairement aux gènes des protéines du lactosérum, les gènes des caséines sont plus complexes. Le gène de la caséine  $\alpha$ S1 est d'une taille d'environ 17500 pb et comporte 19 exons (voir Figure 2).



**Figure 2.** Structure des gènes des caséines alpha S1 ( $\alpha$ S1), alpha S2 ( $\alpha$ S2), bêta ( $\beta$ ) et kappa ( $\kappa$ ). La taille de chaque gène est indiquée à droite et la taille de chaque exon est indiquée au-dessus de ces derniers. La taille des introns n'est pas indiquée. Adapté de Mercier et Vilotte (1993).



### 1.3.2.2 La caséine alpha S2

La caséine  $\alpha$ S2 bovine est une protéine de 25,1 kDa comprenant 207 acides aminés. Elle contient aussi de 10 à 13 groupements phosphates selon le variant génétique. La caséine  $\alpha$ S2 compte pour environ 20% des caséines de type  $\alpha$ S dans le lait. La distribution inégale des acides aminés chargés et hydrophobes à travers la protéine a un effet sur la structure de cette dernière. Les grandes régions hydrophobes vont avoir tendance à minimiser le plus possible les contacts avec l'eau. Ce comportement mène vraisemblablement à une conformation globulaire la plus compacte possible. Le gène codant pour la caséine  $\alpha$ S2 a une taille d'environ 18400 pb et possède 18 exons (voir Figure 2).

### 1.3.2.3 La caséine bêta

La caséine  $\beta$  compte pour environ 25-35% des caséines totales. Cette protéine est constituée de 209 acides aminés pour un poids moléculaire d'environ 23,9 kDa. Elle comprend 5 groupements phosphates estérifiés à des sérines. La portion N-terminale (acides aminés 1-42) contient tous les groupements phosphate et tous les acides aminés contribuant à la charge nette de la molécule. Le reste de la protéine (80%) ne contient pas de charge nette et est fortement hydrophobe. Tout comme les caséines  $\alpha$ S1 et  $\alpha$ S2, la caséine  $\beta$  précipite en présence de calcium mais ce phénomène est fortement dépendant de la température. À 4°C et dans l'environnement ionique du lait, la caséine  $\beta$  est soluble, contrairement aux caséines de type  $\alpha$ S qui vont précipiter en présence de calcium. Avec l'augmentation de la température, la caséine  $\beta$  devient moins soluble et elle tend à s'associer avec d'autres molécules de caséine (Jensen, 1995). Le gène codant pour cette

protéine a une taille réduite par rapport aux caséines de type  $\alpha$ S soit 8500 pb, et démontre une moins grande complexité avec 9 exons (voir Figure 2).

#### **1.3.2.4 La caséine kappa**

La caséine  $\kappa$  fait bande à part dans la famille des caséines. Elle constitue la seule caséine insensible au calcium. La fonction majeure de la caséine  $\kappa$  est d'empêcher la précipitation des autres caséines par le calcium et ce, à travers la formation de micelles (Kaminski, 1996). Le clivage de la protéine par la chymosine au niveau du lien Phe105 – Met106 provoque le relâchement du caséinomacropeptide (voir Figure 3) constituant la portion hydrophile du peptide (Kaminski, 1996; Vreeman et al., 1977). Il en résulte une agrégation des micelles de caséines et une précipitation. Contrairement aux autres caséines qui ont vraisemblablement évolué à partir d'un gène ancestral commun, il semble que la caséine  $\kappa$  démontre une certaine homologie avec les fibrinogènes et plus particulièrement avec le fibrinogène gamma ( $\gamma$ ). Ces protéines possèdent une fonction similaire à celle de la caséine  $\kappa$ ; leur protéolyse partielle mène à la coagulation du sang (Jollès et al., 1974). Cette protéine ne comporte qu'un seul groupe sérine-phosphate et la majeure partie de la charge nette de la molécule ne provient pas de ce groupement. Cela explique en partie pourquoi elle ne précipite pas en présence de calcium. La caséine kappa possède un pont disulfure ce qui est unique parmi les caséines. Cette protéine est constituée d'un peptide de 169 acides aminés pour un poids moléculaire d'environ 19 kDa. Le gène codant pour la protéine comporte moins d'exons que les autres caséines, mais il est d'une taille supérieure à celle du gène de la caséine  $\beta$ , soit 13000 pb (voir Figure 2).



**Figure 3.** Séquence primaire de la caséine kappa. Le site de coupure de la chymosine est indiqué en bleu ainsi que les acides aminés impliqués. Les acides aminés différents pour les allèles A et B de la caséine kappa sont indiqués au-dessus (variant B) et en dessous (variant A) de la séquence complète de la protéine. Adapté de Swaisgood (1992).

Cette caséine est glycosylée; dans un échantillon de lait, on retrouve une population hétérogène de patrons de glycosylation basés sur le nombre et le type d'oligosaccharides présents sur la protéine (Robitaille et al., 1991). Elle représente approximativement 12% du total des caséines dans le lait.

## 1.4 Les micelles de caséine

Le lait peut être amené à ébullition, quelques fois pendant plusieurs heures, sans coagulation, ce qui contraste de façon remarquable avec la plupart sinon avec tous les autres fluides biologiques. Cette caractéristique peu commune est due aux micelles. De plus, l'addition de  $\text{CaCl}_2$  au lait ne fait pas précipiter les micelles, et ce même à des concentrations de loin supérieures à celles nécessaires pour précipiter des caséines purifiées (Holt et Horne, 1996). Les micelles sont le résultat d'un auto-assemblage de différents types de caséines ( $\alpha\text{S1}$  et  $\alpha\text{S2}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ ) avec des ions calcium. Il y a formation d'un lien entre un groupement phosphate de deux caséines et un ion calcium divalent. Il en résulte un pont entre 2 caséines. Des liens multiples de ce genre vont mener à la formation d'une micelle. Ces dernières sont de tailles diverses allant de 25 à 1500 nm de diamètre avec une moyenne de 150 nm (Slattery, 1976). L'élément clé de la micelle est la caséine  $\kappa$ . Avec son glycomacropeptide hydrophile, elle empêche la précipitation des autres caséines présentes dans la micelle. Le fait que la caséine  $\kappa$  se retrouve majoritairement en périphérie des micelles est généralement accepté. Il a d'ailleurs été observé que la proportion de caséine  $\kappa$  diminuait avec l'augmentation du diamètre des micelles (McGann et al., 1980; Donnelly et al., 1984; Davies et Law, 1983) ce qui milite en faveur de son emplacement périphérique. Des études en microscopie électronique utilisant le marquage d'affinité ou encore des techniques immunologiques ont aussi localisé la caséine  $\kappa$  à la surface des micelles (Horisberger et Vonlanthen, 1980; Kudo et al., 1979; Sawyer, 1993). La caséine  $\kappa$  ne précipite pas en présence de calcium. De plus, elle ne se dissocie pas de la micelle lorsque l'on abaisse la température ou encore lorsque l'on ajoute des surfactants à la solution. Conséquemment, la caséine  $\kappa$  n'est pas reliée aux

autres caséines seulement par des liens hydrophobes. Elle n'agit donc pas seulement à titre d'émulsifiant pour les micelles (Creamer et al., 1998). Plusieurs modèles de micelles ont été proposés depuis les années 60. Les modèles doivent expliquer de nombreux phénomènes observables au niveau des micelles : I) la caséine  $\kappa$  doit être accessible à la chymosine pour qu'il y ait clivage du lien Phe105-Met106 et précipitation des micelles; II) le contenu en calcium et en phosphore est de loin supérieur au seuil de solubilité du phosphate de calcium à pH 6,7; III) les laits contenant plus de caséine  $\kappa$  possèdent des micelles ayant une taille moyenne inférieure à celles retrouvées dans les laits contenant moins de caséine  $\kappa$ ; IV) si les micelles sont déstabilisées puis reformées, la distribution de la taille moyenne des micelles devrait être très près de la distribution originale; V) les micelles sont très hydratées et contiennent approximativement 3,7 g d'eau par gramme de protéine; VI) l'addition de caséine  $\kappa$  à une suspension de micelles de caséine résultera en une diminution du diamètre moyen des micelles de la suspension; VII) la caséine  $\kappa$  empêche complètement la précipitation des caséines de type  $\alpha S_2$  à un ratio caséine  $\alpha S_2$  /caséine  $\kappa$  de 10; VIII) la formation de micelles requiert des concentrations de calcium supérieures à celles nécessaires à la précipitation des caséines de type  $\alpha S_1$  et  $\alpha S_2$ ; et IX) à basse température ( $\cong 4^\circ\text{C}$ ), des molécules de caséine  $\beta$  peuvent être libérées dans le sérum et devenir solubles. Ces molécules retournent à la micelle avec l'augmentation de température (Slattery, 1976; Davies et Law, 1983).

#### **1.4.1 Le modèle de Waugh**

Les éléments essentiels de ce modèle sont une association hydrophobe des caséines de type  $\alpha S$  et  $\beta$  qui sont de forme sphérique. Ces agrégats (sous-micelles) sont

recouverts par une monocouche de caséine  $\kappa$ . Ce modèle a été décrit comme le modèle «core-coat» à cause de son noyau hydrophobe stabilisé par la caséine  $\kappa$  en périphérie (Waugh et al., 1970). Les seules molécules de caséine  $\kappa$  pouvant se retrouver à l'intérieur de la micelle seraient celles incluses lors d'une formation rapide de la micelle (Slattery, 1976). Cependant, des évidences expérimentales montrent qu'il y aurait jusqu'à 30% de caséine  $\kappa$  à l'intérieur de la micelle (Ashoor et al., 1971; Pepper, 1972). Ces observations peuvent difficilement être expliquées par ce modèle, ce qui le rend moins pertinent.

#### **1.4.2 Le modèle de Morr**

Cette représentation considère que les sous-micelles sont formées de noyaux composés de caséines de type  $\alpha_S$  liée à du calcium et à du  $\beta$ -caséinate, et entourés d'une couche riche en caséine  $\kappa$ . Ces sous-micelles sont retenues ensemble par des ponts entre des ions calcium ou encore par des ponts calcium-phosphate entre les caséines situées sur les sphères adjacentes (Morr, 1967). Le problème majeur de ce modèle réside dans le fait qu'il propose une distribution pratiquement uniforme de la caséine  $\kappa$  à la surface des sous-micelles (Slattery, 1976). Ceci implique que la surface de la micelle est identique à la surface des sous-micelles qui la compose et donc qu'une possibilité de liaison avec d'autres micelles existe, ce qui n'est pas le cas dans le lait à pH 6,7. De plus, il n'y a pas de mécanisme pour limiter la taille des micelles.

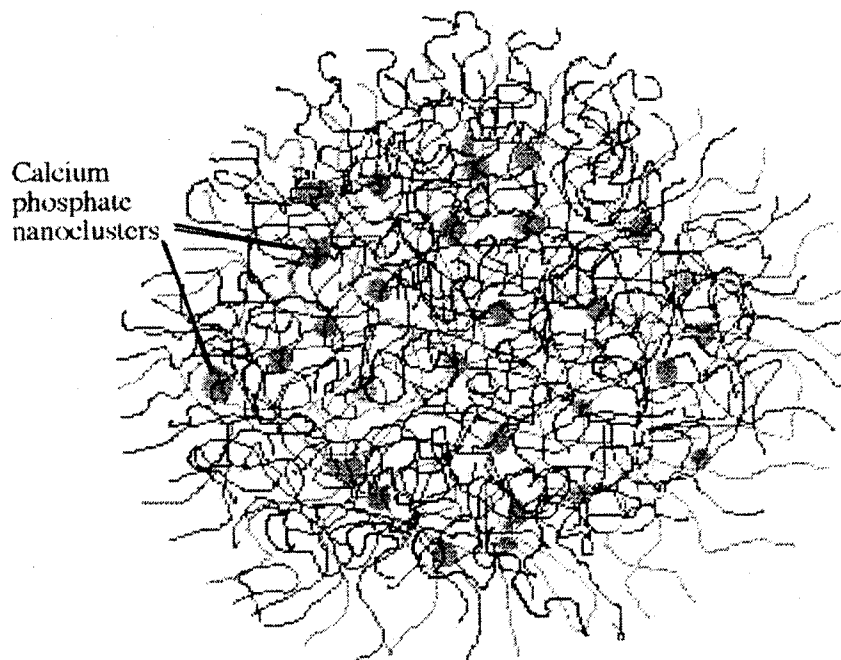
#### **1.4.3 Le modèle de Slattery et Evard**

Selon ces auteurs, les sous-micelles sont représentées comme sphériques et composées de 4 types de caséines ( $\alpha S1$ ,  $\alpha S2$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ ). La proportion de chaque caséine peut varier d'une sous-micelle à l'autre; il existe aussi des interactions entre des molécules de caséine  $\kappa$  qui favorise leur union les unes aux autres. Grâce au caséinomacropéptide, ces molécules se retrouvent exposées au lactosérum. Les caséines de type  $\alpha S$  et  $\beta$  forment des ponts hydrophobes après liaison aux ions calcium. Ces caséines hydrophobes se retrouvent donc dans les parties de la sphère les moins en contact avec le lactosérum (Slattery et Evard, 1973). C'est un modèle qui englobe relativement bien la plupart des phénomènes observables chez la micelle. Cependant, il explique mal comment la caséine  $\beta$  peut quitter la micelle à basse température sans la déstabiliser.

#### **1.4.4 Le modèle de la micelle chevelue**

Ce modèle est probablement le plus accepté aujourd'hui par la communauté scientifique. Il propose ainsi une structure de micelle qui est grossièrement sphérique. Cette dernière serait formée des trois types de caséines reliées entre elles par des ponts calcium-phosphate. On propose donc une micelle dont la composition est comparable au cœur du noyau ainsi qu'à l'extérieur du noyau. L'assemblage des chaînes peptidiques deviendrait graduellement plus lâche vers l'extérieur de la micelle (voir Figure 4; Holt et Horne, 1996). L'appellation «chevelue» provient du fait que la portion C-terminale de certaines molécules de caséine  $\kappa$ , le glycomacropéptide, serait projetée à la surface de la micelle entraînant la formation d'une couche hydrophile chargée négativement. Cette

caractéristique amène donc la répulsion des micelles lorsqu'elles se retrouvent à proximité les unes des autres. L'aggrégation des micelles peut se produire seulement lorsque les «cheveux» sont enlevés de la micelle par l'action enzymatique de la chymosine, ou encore lorsque la structure de la micelle est déstabilisée par acidification entraînant ainsi la neutralisation des charges du caséineomacropéptide (Holt et Horne, 1996).



**Figure 4.** Modèle de la micelle «chevelue». Tiré de Holt et Horne (1996)

### 1.5 Régulation de l'expression des gènes des protéines du lait

La transcription des gènes des protéines du lait est régulée grâce à des interactions complexes entre plusieurs hormones (lactogéniques ou non), facteurs de transcription et aussi par la matrice extracellulaire (MEC) (Edwards et al., 1998; Saito et Oka, 1996;



Rosen et al., 1999). Les principales hormones et facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression des gènes des protéines du lait sont la prolactine (PRL), les glucocorticoïdes, l'hormone de croissance (GH), l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1) et l'insuline.

### **1.5.1 La prolactine**

La PRL influence plusieurs fonctions biologiques dont le fonctionnement des gonades (Kelly et al., 1991) et est aussi responsable de nombreux effets au niveau du système immunitaire (Gala, 1991). Le rôle le mieux caractérisé de cette hormone demeure son habileté à induire le développement lobulo-alvéolaire de la glande mammaire et à stimuler la lactogénèse post-partum. La prolactine est un peptide de 23 kDa principalement synthétisé dans l'hypophyse antérieure des vertébrés (Ali et Ali, 1998). Le récepteur de la PRL (PRLR) est une protéine transmembranaire constituée d'une seule chaîne d'acides aminés. Il appartient à la superfamille des récepteurs des cytokines et est exprimé dans plusieurs tissus (Hennighausen et al., 1997). Des produits d'épissage alternatif engendrent différentes formes du PRLR : une avec une queue cytoplasmique longue et une autre avec une queue courte. Les deux types de récepteur peuvent se dimériser après liaison de la PRL. Cependant, seul le PRLR de forme longue transfecté dans des cellules en culture peut activer la transcription de la  $\beta$ -caséine (Das et Vonderhaar, 1995). Le PRLR est lié de façon constitutive avec des protéines tyrosine kinase Janus de type 2 (JAK2). La dimérisation des récepteurs va causer l'activation des JAK2 qui vont phosphoryler le PRLR. Cette phosphorylation crée un site de reconnaissance pour le facteur de transcription Stat5 (signal transducer and activator of transcription 5), qui devient aussi phosphorylé sur un seul résidu tyrosine. Le facteur

Stat5 se dissocie donc du récepteur et se dimérise avant de transloquer au noyau (Watson, 2001). Le dimère interagit alors avec le promoteur des protéines du lait contenant, entre autres, un site d'activation semblable à celui de l'interféron- $\gamma$  (séquence GAS-like; TTCNNNGAA) (Hennighausen et al., 1997). Fait à noter, tous les gènes des protéines du lait contiennent un site de liaison à Stat5 dans leur promoteur (Rosen et al., 1999). Il existe 2 formes du facteur Stat5 chez la souris : Stat5a et Stat5b. Ces deux formes sont issues de gènes très semblables (Azam et al., 1995; Mui et al., 1995) et sont exprimées de façon constitutive dans la glande mammaire à tous les stades de son développement (Liu et al., 1996). Stat5a et Stat5b sont capables d'agir indépendamment en tant qu'homodimère ou en combinaison en tant qu'hétérodimère (Ripperger et al., 1995). Malgré leur homologie de 93- 96% au niveau de la séquence d'acides aminés (Rosen et al., 1999; Hennighausen et al., 1997), il semble que Stat5a et Stat5b démontrent des différences au niveau fonctionnel. Des souris déficientes en Stat5a (Liu et al., 1997) ou en Stat5b (Udy et al., 1997) présentent un développement mammaire anormal et sont incapables d'induire une lactation. Ces évidences démontrent que les 2 isoformes ont des fonctions distinctes au niveau de la glande mammaire.

### **1.5.2 Les glucocorticoïdes**

Les glucocorticoïdes sont une famille d'hormones stéroïdiennes synthétisées par la zone corticale des glandes surrénales à partir du cholestérol comme la cortisone, qui est elle-même dérivée du cortisol. Les glucocorticoïdes possèdent entre autres des propriétés anti-inflammatoires. Elles inhibent la transcription des gènes de nombreuses cytokines et chemokines comme l'interleukine 1 $\beta$ , le tumour necrosis factor et le granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Adcock, 2001). Comme elles sont des hormones

stéroïdiennes, les glucocorticoïdes entrent directement dans la cellule. Elles se lient à un récepteur cytoplasmique qui est associé à la protéine de choc thermique 90 (HSP90). Cette protéine est larguée et le complexe hormone-récepteur migre jusqu'au noyau où il se liera à une séquence consensus, l'élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) dans le promoteur de gènes cibles (Thépot et Houdebine, 1999). Dans le cas des gènes des caséines, ce mécanisme ne semble pas être de première importance. Ces gènes répondent moins rapidement et sont aussi moins dépendants des glucocorticoïdes que les gènes d'autres protéines du lait. Les séquences GRE retrouvées dans leurs promoteurs sont dégénérées (Welte et al., 1993) mais semblent être fonctionnelles (Lechner et al., 1997). Il existe un autre mécanisme d'action des glucocorticoïdes au niveau des gènes des caséines. Le complexe glucocorticoïde-récepteur (GR) des glucocorticoïdes interagit avec Stat5 phosphorylé par l'action de la PRL pour aller activer la transcription des gènes des protéines du lait. Il en résulte une activation plus grande que la somme des effets individuels dus à la PRL et aux glucocorticoïdes. Selon Stöcklin et al. (1996), le complexe glucocorticoïde-GR-Stat5 ne se lie pas à une séquence GRE mais à un site de reconnaissance de Stat5, laissant supposer que le complexe glucocorticoïde-GR agit à titre de coactivateur (Thépot et Houdebine, 1999). Cependant, selon Lechner et al. (1997), les séquences GRE sont essentielles au bon fonctionnement de l'activation de la transcription par les glucocorticoïdes. De plus, les auteurs font mention que des rôles impliquant ou non une liaison à l'ADN, en interaction avec d'autres facteurs de transcription, ont été démontrés pour Stat5 et GR.

### 1.5.3 L'insuline et l'insulin-like growth factor-1

L'insuline est une hormone sécrétée par le pancréas endocrine et sa fonction première est de maintenir un niveau acceptable de glucose dans le sang. Le rôle exact de l'insuline au niveau de l'expression des gènes des protéines du lait est encore un sujet de controverse. Son action semble différente *in vivo* et *in vitro*. L'infusion simultanée de caséines au niveau de l'abomasum (la quatrième division de l'estomac chez les ruminants) et d'insuline par voie intraveineuse hausse la production de protéines du lait de 28% chez la vache (Grinari et al., 1997) tandis qu'*in vitro*, sa présence ne semble pas être requise pour l'expression des gènes des protéines du lait (Doppler et al., 1989). Des travaux récents ont révélé que le récepteur de l'insuline pouvait se lier et phosphoryler Stat5 (Chen et al., 1997). Il existerait sans doute une interaction entre l'insuline et la prolactine au niveau de Stat5. L'insulin-like growth factor-1 (IGF-1) et l'insuline peuvent avoir des activités biologiques similaires grâce à leur homologie de structure et grâce au fait qu'ils peuvent interagir chacun avec le récepteur de l'autre (de Pablo et Roth, 1990). Il a de plus été prouvé que l'insuline ainsi que IGF-1 stimulaient la synthèse d'ADN *in vitro* dans des explants de glande mammaire en lactation (Baumrucker et Stemberger, 1989). Il y a peu d'évidence supportant un effet galactopoïétique direct d'IGF-1 chez les ruminants. Cependant, en utilisant des cellules épithéliales mammaires de souris *in vitro*, on a démontré qu'IGF-1 était en mesure de promouvoir l'activité de la  $\beta$ -caséine et de l' $\alpha$ -lactalbumine à des concentrations de loin supérieures à celles requises pour l'insuline (Prosser et al., 1987). À l'opposé, une étude réalisée à l'aide d'une culture primaire de cellules de glande mammaire de souris gestante a démontré que l'IGF-1 ne stimulait pas la production d' $\alpha$ -lactalbumine et n'augmentait pas les effets des hormones lactogéniques (Fielder et al., 1992). Même si de nombreuses données suggèrent une influence d'IGF-1

sur la lactation, les évidences sur son mécanisme d'action sont limitées. La compréhension de ce mécanisme est rendue plus compliquée à cause de l'association d'IGF avec huit protéines porteuses, les IGF binding protein (IGFBP) (Cohick, 1998). Le rôle de ces dernières ne sera pas discuté dans ce travail.

#### **1.5.4 La matrice extracellulaire**

La matrice extracellulaire (MEC) joue plusieurs rôles essentiels durant tous les stades de développement de la glande mammaire (prolifération, formation des bourgeons, maintien d'un phénotype différencié chez les cellules épithéliales mammaires). Un des rôles de la MEC durant la lactation demeure la régulation de l'expression des gènes des protéines du lait. Elle induit premièrement un changement morphologique des cellules épithéliales mammaires. Ce changement est nécessaire mais non suffisant pour l'expression du gène de la  $\beta$ -caséine (Roskelley et al., 1994). De plus, en présence d'hormones lactogéniques, la MEC produirait un signal qui induirait l'expression des gènes des protéines du lait. Les laminines et plus spécialement la laminine-1 sont les éléments de la MEC impliqués dans la transmission de ce signal. Les intégrines  $\beta_1$  ainsi que  $\alpha_6\beta_4$  sont aussi impliquées dans ce processus (Rosen et al., 1999; Streuli et al., 1995; Streuli et al., 1991; Muschler et al., 1999). Dans les cellules épithéliales mammaires de souris, la PRL active Stat5 seulement en présence de MEC riche en laminine. Le collagène 1 seul est sans effet dans les mêmes conditions de culture (Edwards et al., 1998). L'activation de Stat5 implique une phosphorylation sur la tyrosine 694. Cette phosphorylation induite par la PRL est rapide mais passagère. On a observé qu'en présence de pervanadate de sodium, un inhibiteur de tyrosine phosphatase, la phosphorylation de Stat5 était maintenue. Il semblerait donc qu'une des actions de la

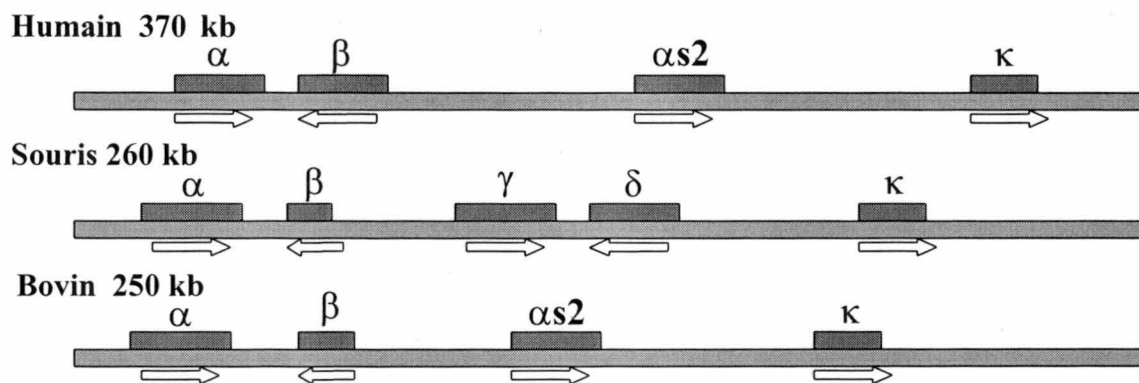
MEC serait d'inhiber l'action d'une protéine tyrosine phosphatase qui tendrait à empêcher la stimulation faite par la PRL (Edwards et al., 1998). Cette hypothèse a été appuyée par des travaux récents. En effet, on a observé qu'une protéine tyrosine phosphatase cytosolique, la protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), déphosphorylait spécifiquement Stat5a et Stat5b *in vitro*. De plus, l'activation de la transcription du gène de la  $\beta$ -caséine dépendante de la PRL est aussi inhibée par l'action de PTP1B (Aoki et Matsuda, 2000). On peut donc affirmer que la MEC, entre autres via les laminines, joue un rôle essentiel dans l'expression des gènes des protéines du lait.

### **1.5.5 L'hormone de croissance**

La GH est produite par l'hypophyse antérieure. Elle possède une séquence de 190 ou 191 acides aminés avec 4 variants majeurs, en proportion variable selon les races laitières (Chilliard et al., 1998). La réalité d'une action directe de la GH sur la glande mammaire reste controversée car jusqu'à présent, il fut impossible de détecter des récepteurs de la GH au niveau des cellules épithéliales mammaires (Keys et Djiane, 1988). Toutefois, la détection d'ARNm codant pour ces récepteurs dans la glande mammaire de vache (Glimm et al., 1990) et de brebis (Jammes et al., 1991) montrent que leur synthèse y est possible. Cependant, l'infusion de GH directement dans la glande mammaire n'augmente pas la production laitière et donc, n'a pas d'effet sur la transcription des gènes des protéines du lait (McDowell et al., 1987). Le seul argument en faveur d'une action directe de la GH sur le tissu mammaire des ruminants est l'augmentation de la synthèse d'IGF-1 par ce tissu *in vitro* (Glimm et al., 1992) ou *in vivo* (Prosser et al., 1991; Sharma et al., 1994). L'IGF-1 est donc considéré comme étant le principal médiateur de l'action galactopoïétique de la GH.

## 1.6 Le locus des caséines

Des études menées par Rijnkels et ses collaborateurs (Rijnkels et al., 1997a, b et c) ont déterminé sans ambiguïté que les gènes encodant les caséines sont voisins. Les quatre caséines bovines ( $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2,  $\beta$  et  $\kappa$ ) sont codées par des gènes ayant une seule copie dans le génome. Le locus des caséines bovines est situé sur le chromosome 6 et présente une taille d'environ 250 kb (Rijnkels et al., 1997b). Les caséines bovines sont présentes dans l'ordre suivant :  $\alpha$ S1,  $\beta$ ,  $\alpha$ S2 et  $\kappa$ . Un travail systématique a permis d'isoler le locus des caséines de souris, de la vache et de l'homme à partir de banques de chromosome artificiel de levure (YAC). Les trois loci sont organisés de la même manière et l'ordre des différents gènes est conservé (Figure 5). De façon inattendue, les 2 gènes les plus exprimés chez la vache, ceux de la caséine  $\alpha$ S1 et  $\beta$ , sont disposés en sens opposé. Chez la drosophile, chez qui les loci comprenant des gènes en orientation opposée sont fréquents, il a été proposé que l'inversion puisse être un moyen de maintenir un petit génome (Snyder et al., 1982). Cela pourrait aussi réduire la fréquence d'excision par recombinaison intrachromosomale (Rijnkels et al., 1997c). Les gènes des caséines  $\alpha$ S2 et  $\kappa$  sont disposés dans le même sens que le gène de la caséine  $\alpha$ S1. Les gènes des caséines  $\alpha$ S1 et  $\beta$  sont relativement près l'un de l'autre, quoiqu'à des distances variables (de 10 à quelques dizaine de kb) selon les espèces. Ces observations suggèrent que des éléments de régulation majeurs se trouvent à proximité de ces gènes. L'éloignement des 2 autres gènes des caséines pourrait expliquer leur taux d'expression plus faible.



**Figure 5.** Représentation du locus des caséines chez l'humain, la souris et le bovin.  
Adapté de Rijnkels et al., (1997).

### 1.7 Les variants protéiques des caséines

Les variants protéiques représentent la conséquence d'un phénomène de polymorphisme au niveau d'un gène. Ce dernier existe donc sous plusieurs formes. Les variants génétiques vont se différencier par des mutations, silencieuses ou non, situées dans toutes les parties du gène (introns, exons, parties non-codantes 5' et 3' ou encore dans le promoteur). Les variants protéiques quant à eux vont se différencier par divers changements d'acides aminés dans leur séquence primaire. Historiquement, les variants protéiques des caséines ont été découverts par électrophorèse et donc, grâce à leurs différences de charges. Les différentes formes de gène vont produire des protéines avec des propriétés qui leur sont caractéristiques. Conséquemment, les variants des caséines auront un impact différent sur la production laitière; impact qui variera considérablement selon le variant génétique présent dans le lait de chaque race de vache laitière. Il y a un intérêt mondial pour la localisation des loci contribuant au rendement laitier par l'utilisation de marqueurs génétiques. Un grand nombre d'études ont porté sur les gènes des 4 caséines bovines (Vonderhaar et Ziska, 1989). La plupart des études sur les allèles



des caséines ont traité les gènes indépendamment et effectué des tests statistiques dans le but d'évaluer les effets directs de chaque génotype. Cependant, les gènes de structure des caséines sont très étroitement liés de sorte que l'unité génétique de transmission est l'haplotype, une combinaison comprenant un allèle de chacun des quatre loci (Grosclaude, 1988). Les nombreuses variations observées entre les différentes études peuvent provenir du modèle d'analyse statistique mais aussi de la structure et de la taille de l'échantillonnage (Ojala et al., 1997).

### **1.7.1 Les caséines alphaS1 et alphaS2**

Les effets de la caséine  $\alpha$ S1 ont été étudiés et observés dans quelques études seulement, car la fréquence du variant B chez la plupart des vaches laitières est d'environ 95%. Ces études ont démontré que les différents allèles de la caséine  $\alpha$ S1 ont très peu d'influence sur le contenu en protéines du lait. On a cependant constaté que l'allèle C pouvait être associé à une plus grande quantité de caséines dans le lait de l'ordre de 0,3 g/l (Jakob et Puhon, 1995). La caséine  $\alpha$ S2 semble être monomorphe dans la plupart des espèces laitières communes. Un variant a toutefois été identifié ( $\alpha$ S2-CN D) chez les races Vosgienne et Montbéliarde (Grosclaude et al., 1978). L'impact de son expression sur la production laitière a été très peu étudié.

### **1.7.2 La caséine bêta**

Les deux variants de la caséine  $\beta$  universellement répandus chez les bovins sont  $\beta$ -CN A1 et  $\beta$ -CN A2 et ce dans une proportion d'environ 85%. On retrouve aussi les allèles A3, B et C. Les vaches possédant le génotype A1A1 ont démontré une production

de lait supérieure aux vaches ayant des génotypes A1B et BB (155 et 320 kg par an, respectivement). Il est à noter que les vaches A1B et BB ont cependant produit un lait avec une plus grande teneur en gras et en protéines totales (Bovenhuis et al., 1992). Ces observations laissent supposer que l'haplotype contenant l'allèle B pourrait avoir une influence significative sur le taux de gras du lait.

### **1.7.3 La caséine kappa**

La caséine  $\kappa$  possède de nombreux allèles dont quelques-uns ont été découverts récemment. Les variants A et B sont les plus souvent rencontrés chez les différentes races de vaches laitières. Les différences entre les 2 allèles comprennent des substitutions d'acides aminés aux positions 136 et 148 (Thr-Ile et Asp-Ala; A-B). Il existe aussi 9 autres variants nommés C, E, F<sup>s</sup>, F<sup>l</sup>, G<sup>S</sup>, G<sup>E</sup>, H, I et J qui sont aussi issus de substitutions d'acides aminés (voir Tableau 1). Le variant B est souvent associé à une plus grande quantité de protéines totales et de caséine  $\kappa$  dans le lait (Grosclaude, 1988; Jakob et Puhon, 1995; Bovenhuis et al., 1992; Coulon et al., 1998). Pour accommoder toutes les molécules de caséine  $\kappa$  à la surface des micelles, les laits contenant une plus grande proportion de caséine  $\kappa$  doivent avoir une plus grande surface spécifique et donc un diamètre micellaire réduit. Conséquemment, le temps de caillage est réduit pour les laits contenant le variant B de la caséine  $\kappa$  par rapport au variant A. Cependant, ce phénomène de caillage plus rapide pourrait tout simplement être expliqué par le fait que de petites micelles requièrent moins de clivage enzymatique de la part de la chymosine pour amener leur précipitation (Jakob et Puhon, 1995). Il a aussi été démontré que chez certaines vaches hétérozygotes AB, les protéines issues de ces deux allèles étaient synthétisées en quantités différentes (Robitaille et Petitclerc, 1998, 2000).

### Position des acides aminés et substitutions

Variant	10	97	104	135	136	148	155
A	Arg	Arg	Ser	Thr	Thr	Asp	Ser
B					Ile	Ala	
C		His					
E							Gly
F <sup>s</sup>						Val	
F <sup>l</sup>	His				Ile	Ala	
G <sup>s</sup>						Ala	
G <sup>E</sup>		Cys			Ile	Ala	
H				Ile			
I			Ala				
J							Arg

**Tableau 1.** Position des acides aminés des différents variants génétiques de la caséine kappa. Adapté de Swaisgood (1992).

### 1.8 Expression différentielle

L'expression différentielle, ou polymorphisme d'expression, représente un phénomène par lequel un allèle d'un gène est plus exprimé qu'un autre. Des mutations dans la séquence du gène peuvent affecter le niveau de transcription de chaque allèle, le processus normal de maturation des ARNm ou encore la stabilité de ces derniers. Il existe un exemple bien connu de polymorphisme d'expression; il s'agit du gène de la caséine  $\alpha$ S1 chez la chèvre. Ce gène comporte plusieurs allèles, chacun étant associé à un niveau de synthèse différent de la protéine : ces allèles sont qualifiés de forts, moyens, faibles ou nuls, et correspondent à des concentrations de caséine  $\alpha$ S1 dans le lait entre 0 et 3,6 g/l (Grosclaude et al., 1994). Les variants forts et intermédiaires ne se différencient que par

des substitutions d'acides aminés (Brignon et al., 1989), tandis que les variants associés à un niveau de synthèse faible se distinguent, au niveau protéique, par des délétions internes dues à des erreurs d'épissage (Brignon et al., 1990). De nombreux variants démontrent des anomalies mais nous nous limiterons à décrire 2 d'entre eux : les variants E et F. Le variant E présente une insertion de 457 pb dans le 19<sup>e</sup> et dernier exon du gène. Cet exon spécifie l'essentiel de la partie 3' non codante du messager (Martin, 1993). Cette insertion, qui correspond aux vestiges d'un rétrotransposon de type long interspersed element (LINE), induirait une réduction de la stabilité des ARNm codés par cet allèle et amènerait ainsi une réduction du taux de synthèse de la protéine (Perez et al., 1994).

Le variant F, quant à lui, présente une délétion interne de 37 résidus d'acides aminés. Cette délétion résulte d'une anomalie d'épissage des transcrits primaires, induite par la délétion d'un nucléotide dans la séquence de l'exon 9. Cette délétion unique mène à la formation de différents transcrits dans lesquels les exons 9, 10 et 11 sont majoritairement éliminés (Martin, 1996). Les mécanismes par lesquels cette mutation ponctuelle affecte le niveau d'expression de l'allèle F restent à élucider. L'apparition d'un codon stop prématuré a été avancée, et la multiplicité de transcrits pourrait traduire une perturbation profonde du processus d'épissage (Martin et Leroux, 2000). L'étude de ces divers variants a permis d'apporter un certain éclairage sur le phénomène d'expression différentielle mais elle a aussi le mérite d'avoir soulevé de nombreuses interrogations sur les mécanismes qui déterminent l'efficacité et la précision des opérations d'épissage des transcrits primaires (Martin et Leroux, 2000). Un autre exemple de polymorphisme d'expression a été observé chez les bovins au niveau du gène de la  $\beta$ -lactoglobuline. Dans le lait des vaches hétérozygotes AB pour ce gène, on retrouve 1,5

fois plus de protéines du variant A que du variant B (Graml et al., 1989; Wilkins et al., 1995). Il a été suggéré que des mutations dans le promoteur du gène affectent l'activité transcriptionnelle de manière à ce que l'allèle A soit exprimé avec une plus grande efficacité (Folch et al., 1999; Prosser et al., 2000).

### **1.9 Hypothèse de travail**

Il a été observé que la présence de différents variants génétiques des protéines du lait pouvait avoir un impact sur certaines propriétés technologiques de ce dernier. Le polymorphisme de la caséine kappa en particulier a une influence sur la composition du lait, ses propriétés physico-chimiques et le rendement fromager. Le génotype BB de la caséine kappa a été associé à plusieurs propriétés avantageuses comparativement aux génotypes AA ou encore AB. Parmi ces dernières, on note un contenu plus élevé en caséines (Ng-Kwai-Hang et al., 1984, 1986), une plus grande stabilité à la chaleur (Robitaille, 1995) et un temps de coagulation par la chymosine plus court (Walsh et al., 1998; Grosclaude, 1988). Certaines variations dans les propriétés du lait découlent d'un phénomène intéressant : l'expression différentielle des deux allèles les plus fréquents chez les vaches de race Holstein pour la caséine kappa, les allèles A et B (Ng-Kwai-Hang, 1984). Il a été démontré dans notre laboratoire que l'allèle B était exprimé avec une plus grande efficacité qu'une sous population d'allèle de type A (Robitaille et Petitclerc, 1998, 2000). Cette différence se répercute aussi au niveau protéique car on constate une plus grande quantité de caséines kappa B dans le lait de certaines vaches hétérozygotes (Van Eenennaam et Medrano, 1991; Robitaille et Petitclerc, 2000). La cause de ce polymorphisme est jusqu'ici inconnue. Une question se pose à savoir si ce polymorphisme est maintenu tout au long de la lactation. Au cours des divers stades de

lactation, les niveaux physiologiques des hormones lactogènes et non lactogènes varient grandement afin de moduler l'expression des gènes responsables directement ou indirectement de la production des composantes du lait, et plus particulièrement des caséines (Das et Vonderhaar, 1995; Thépot et Houdebine, 1999; Grinari et al., 1997; Glimm et al., 1992).

Donc, à la lumière des observations faites dans notre laboratoire, nous avons émis l'hypothèse que le polymorphisme d'expression du gène de la caséine kappa n'était pas affecté par le stade de lactation, et qu'il pourrait aussi exercer une influence sur la composition du lait tout au long de la période de lactation. Les résultats de cette étude pourraient éventuellement mener à l'utilisation de la caséine kappa comme marqueur génétique.

## **CHAPITRE II**

### **2 MATÉRIELS ET MÉTHODES**

#### **2.1 Animaux utilisés**

Les vaches de la présente étude faisaient partie du troupeau laitier du centre de recherche sur le porc et le bovin laitier d'Agriculture et Agroalimentaire Canada à Lennoxville. Toutes les vaches hétérozygotes AB pour le gène de la caséine kappa de ce troupeau ont été utilisées (n = 30).

#### **2.2 Récolte des échantillons de lait**

Un échantillon de lait d'environ 40 ml a été recueilli manuellement lors de la traite du matin pour chaque vache faisant partie de l'étude. Les échantillons ont été prélevés à des intervalles de 30 jours de lactation (4-8 jours d'échantillonnage/ vache) pour couvrir la lactation en entier. Les échantillons ont été conservés à 4°C jusqu'à l'extraction de l'ARN, processus qui a eu lieu dans un délai maximum de 2 heures après la traite. Les cellules somatiques, c'est-à-dire les cellules épithéliales mammaires, qui sont détachées de la glande lors de la traite se retrouvent dans le lait. C'est à partir de ces cellules que se fera l'extraction d'ARN.

#### **2.3 Extraction de l'ARN des cellules somatiques du lait**

Vingt ml de PBS à 4°C (Sigma Phosphate buffered Saline tablets, USA) ont été ajoutés à 20 ml de lait dans un tube conique à bouchon vissé de 50 ml (Sarsted). Les tubes ont été conservés sur glace avant d'être centrifugés à 2500 révolutions par minutes

(RPM) pendant 10 minutes à 4°C. La crème a été enlevée et le lactosérum décanté. Cinq cent µl de Trizol (Invitrogen Life Technologies) ont été ajoutés à chaque culot. Ces derniers ont été homogénéisés en pipetant doucement puis incubés pendant 5 minutes à la température de la pièce. Les homogénats ont été transférés dans des tubes Eppendorf de 0,5 ml à paroi épaisse. Deux cent cinquante µl de chaque solution ont été prélevés puis transférés dans un autre tube (ce volume a été gardé comme matériel de réserve pour une extraction future). Deux cent µl de Trizol ont été ajoutés aux 250 µl d'homogénat restant suivis de 100 µl de chloroforme. Les tubes ont été mélangés par inversion pendant 15 secondes puis centrifugés à 12 000 RPM pendant 15 minutes à 4°C. La phase aqueuse a été transférée dans un autre tube Eppendorf de 0,5 ml à paroi épaisse. Les tubes ont été centrifugés à nouveau pour s'assurer d'éliminer tout précipité présent dans la solution. Un µl de glycogène a été ajouté (molecular biology grade; 20 mg/ ml, Roche Diagnostics, Laval, Qc) à la solution aqueuse récupérée, 250 µl d'isopropanol ont été incorporés et les tubes ont été laissés 10 minutes à la température de la pièce. Ces derniers ont été centrifugés à nouveau à 12 000 RPM pendant 10 minutes à 4°C. La phase organique a été éliminée et le culot a été rincé avec 400 µl d'éthanol 75% (v/v). Une centrifugation à 7500 RPM pendant 5 minutes à 4°C a suivi le rinçage du culot. L'éthanol a été décanté et les tubes ont été centrifugés de nouveau selon les mêmes paramètres. Les derniers µl d'éthanol ont été enlevés et le culot a été séché à l'air pendant environ 5 minutes. Les culots ont été resuspendus dans 40 µl d'eau sans RNase. Les échantillons ont été transférés à - 80°C et conservés à cette température jusqu'à leur utilisation.



## 2.4 HPLC

Les caséines ont été obtenues par précipitation acide avec de l'acide acétique (50 µl d'acide acétique 20% (v/v) par 1 ml de lait). Le culot de caséines obtenu a été resuspendu au volume initial dans une solution d'eau + NaOH 20 mM (180 µl de NaOH 20 mM par 1 ml de lait). Cent µl de cette resuspension ont été prélevés et dilués 1:10 dans de l'acide trifluoroacétique (TFA) puis filtrés sur filtre de 0,45 µm. Cinquante µl de ce filtrat ont ensuite été utilisés pour l'analyse. La séparation des caséines a été réalisée par HPLC (System Gold #2, Beckman) en phase inverse à l'aide d'une colonne Vydac C4. L'élution a été effectuée en fonction d'un gradient linéaire (42% à 62% de tampon B en 38 minutes) à partir de 2 tampons et en employant un débit de 1ml/min; Tampon A : 0,1% (v/v) TFA/ H<sub>2</sub>O, Tampon B : 0,096% TFA/ Acétonitrile 80% (v/v). L'identification des pics correspondant aux différentes caséines a été établie à partir des travaux de Visser et al., (1991). Le contenu relatif en caséines a été défini à partir de l'aire des pics correspondant à chaque type de caséine sur la somme de l'aire de tous les pics, en pourcentage.

## 2.5 Marquage des amorces et mesure de l'incorporation de la radioactivité

Les amorces ont été sélectionnées à partir de la séquence publiée de la caséine κ (numéro d'accèsion de GenBank : X14908). L'amorce sens située dans l'exon IV tandis que l'amorce antisens était située dans l'exon V (amorce sens : 5'-TGTGCTGAGTAGGTATCCTAGTTATGG-3'; amorce antisens: 5'-GTTTGAAGTCATTTGGTTTCAGC-3'). Vingt-cinq µl d'eau sans RNase ont été ajoutés à un tube de Ready-To-Go T4 Polynucleotide Kinase (Amersham Pharmacia

Biotech, Piscataway NJ). Le tube a été laissé à la température de la pièce pendant 3 minutes puis le contenu a été mélangé en pipetant doucement. Ensuite, 1,5 µl d'amorce (10 µM) et un volume d'eau suffisant pour amener le volume de la réaction à 48 µl ont été ajoutés et 2 µl de  $[(\gamma\text{-}^{32}\text{P})]$  ATP (5000 Ci/mM, 10 µCi/ µl, Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Qc) ont été incorporés à la réaction en mélangeant doucement. Un tube a été utilisé pour chaque amorce. La solution a été incubée à 37°C pour 35 minutes puis à 68°C pour 10 minutes pour arrêter la réaction. Un µl de la réaction a été prélevé et déposé dans un vial à scintillation. Le reste de la solution a été déposé au centre d'une colonne MicroSpin<sup>TM</sup> G-25 (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Qc), préalablement préparée selon les recommandations du fabricant, pour enlever les nucléotides radioactifs n'ayant pas été incorporés. Une colonne a été utilisée pour chaque amorce. La solution d'amorce filtrée a été conservée à 4°C jusqu'à son utilisation. Un µl du mélange filtré a été prélevé et a été déposé dans un vial à scintillation. Après ajout de liquide à scintillation (Ready Solv HP, Beckman Coulter), un comptage radioactif a été effectué pour les 2 prélèvements à l'aide d'un compteur Bêta (Liquid scintillation Analyser Tri-Care 2900 TR, Packard). L'incorporation de  $^{32}\text{P}$  a été mesurée dans le but de déterminer si la réaction de marquage avait fonctionné avec assez d'efficacité. L'incorporation de radioactivité permettra la visualisation du patron de bandes obtenu sur un film d'autoradiographie après les étapes de RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) et de SSCP (single strand conformation polymorphism).

## **2.6 Reverse transcription polymerase chain reaction**

L'étape de RT-PCR a été effectuée en employant le kit TITAN One Tube RT-PCR System (Roche Diagnostics, Laval, Qc). La réaction ciblait l'ARNm de la caséine

kappa. Les ADNc ont été synthétisés dans un volume réactionnel de 25 µl : 5 µl de tampon de réaction (20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 7,5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5), 0,4 µl de chaque dNTP, 1,25 µl de dithiothréitol (DTT, 100 mM), 2,5 unités d'inhibiteur de RNase (40 unités/ µl, Roche Diagnostics, Laval Canada), 1 µl de chaque amorce froide (0,4 µM final) (les mêmes amorces utilisées pour le marquage au <sup>32</sup>P), 2,5 µl de chaque amorce marquée et 1 µl de la solution d'enzyme (Expand High Fidelity enzyme mix, reverse transcriptase, AMV). Le volume a été complété à 25 µl avec de l'eau sans RNase. La synthèse des ADNc a été effectuée à une température de 50°C pendant 35 minutes suivie d'une étape d'inactivation de l'enzyme à 94°C pour 2 minutes 30 secondes. Le cycle d'amplification PCR avait les paramètres suivants : étape de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, étape d'hybridation à 55°C pendant 45 secondes, étape d'élongation à 68°C pendant 1 minute. Ce cycle d'amplification a été répété 29 fois suivi d'une dernière étape d'élongation de 7 minutes à 68°C. Une portion du volume de chaque réaction PCR a été déposée sur un gel d'agarose 2% puis visualisée après incubation dans un bain de bromure d'éthidium. Deux µl d'une réaction PCR ont été prélevés et dilués dans 48 µl d'eau, 25 µl ont été déposés dans un vial à scintillation et le reste de la dilution a été déposé au centre d'une colonne MicroSpin S-300 HR (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Qc), préalablement préparée selon les recommandations du fabricant, pour enlever les amorces n'ayant pas été incorporées dans les produits d'amplification. Après ajout de liquide à scintillation (Ready Solv HP, Beckman Coulter), un comptage radioactif a été effectué pour les 2 prélèvements à l'aide d'un compteur Bêta (Liquid scintillation Analyser Tri-Care 2900 TR, Packard). L'incorporation de <sup>32</sup>P a été mesurée dans le but de déterminer si les amorces marquées avaient été incorporées efficacement pendant la réaction de PCR.

## 2.7 Single strand conformation polymorphism

Le gel d'électrophorèse utilisé pour le SSCP était constitué de trois portions distinctes : le gel concentrateur, le gel séparateur et le gel d'arrêt. Le gel concentrateur était constitué de 33,3% d'acrylamide (40% p/v, 100:1, acrylamide/ bis-acrylamide, Bio Rad, Hercules, CA), de 10% (v/v) d'eau, de 10% de TBE (v/v), de 0,2% de TEMED (v/v) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), de 45% de formamide (v/v) (Sigma, St-Louis, MO) et 1,5% (v/v) de persulfate d'ammonium 10% (p/v) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Le gel séparateur comportait une portion d'acrylamide de 29,2% (40% p/v, 100:1, acrylamide/ bis-acrylamide, Bio-Rad, Hercules, CA), de 60% d'eau (v/v), de 10% de TBE (v/v), de 0,07% de TEMED (v/v) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) et de 0,7% (v/v) de persulfate d'ammonium 10% (p/v) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Le gel d'arrêt avait une concentration d'acrylamide de 49,5% (v/v) (40% p/v, 100:1, acrylamide/ bis-acrylamide, Bio Rad, Hercules, CA), de 39,8% d'eau (v/v), de 10% de TBE (v/v), de 0,06% de TEMED (v/v) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) et de 0,6% (v/v) de persulfate d'ammonium 10% (p/v) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Le gel avait une épaisseur de 0,75mm et il a été monté à l'aide de plaques de 20 cm x 22 cm et de 20 cm x 20 cm. Deux  $\mu$ l de chaque réaction de RT-PCR ont été dilués dans 38  $\mu$ l de tampon d'échantillon [48% de formamide (v/v) (Sigma, St-Louis, MO), 48% d'eau (v/v) et 4% d'EDTA 0,25M (v/v), bleu de bromophénol (Sigma, St-Louis, MO), dénaturés à 94°C pour 3 minutes puis immédiatement placés sur glace pour conserver la conformation simple brin de l'ADN. Les échantillons ont été déposés en duplicata sur le gel à raison de 20  $\mu$ l par puit. La migration des échantillons a été réalisée avec un appareil Protean™ II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) dans un gel pré-refroidi à 4°C à l'aide d'un bain à température réglable Multi Temp III Thermostatic Circulator

(Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Qc). La première partie de la migration a été effectuée à 4°C pendant 30 minutes suivie d'une deuxième étape à 15°C pendant 18 heures avec un voltage constant de 350 volts.

## **2.8 Autoradiographie**

Les gels ont été démoulés et conservés sur la vitre ayant servi à leur montage. Une pellicule d'emballage plastique a été employée pour conserver le taux d'hydratation du gel et l'empêcher de coller à la cassette d'autoradiographie ainsi qu'au film. Un film d'autoradiographie (BioMax MR-1 Film, Kodak, Rochester, NY) a été déposé sur le gel et gardé à 4°C pour un temps d'exposition de 20-24 heures.

## **2.9 Densitométrie**

Les patrons de bandes obtenus sur les autoradiogrammes ont été numérisés à l'aide d'un numériseur (GS-670, Bio-Rad) et analysés avec le logiciel Molecular analyst (Bio Rad). L'intensité des bandes a été mesurée en densité optique par mm<sup>2</sup>. Les valeurs obtenues pour l'allèle A et l'allèle B de la caséine kappa, sens et antisens) ont été comparées entre elles [rapport B/ (A+B)\*100] pour obtenir une proportion relative de l'expression de chacun des allèles.

## **2.10 Analyse statistique**

Le test de Student a été employé pour déterminer si les populations d'animaux homozygotes et hétérozygotes d'expression constituaient deux populations distinctes. La procédure Proc Mixed du logiciel SAS (Littell et al., 1996) a aussi été utilisée pour déterminer si le stade de lactation avait un effet sur le polymorphisme d'expression de la caséine kappa. Nous avons séparé le facteur stade de lactation en périodes de 100 jours

(Stade 1; n = 4) et de 30 jours (Stade 2; n = 11), allant de 0 à plus de 300 jours. Le hasard fait que nous avons un nombre très limité d'échantillons correspondant au stade 240-270 jours pour les vaches ayant un phénotype hétérozygote d'expression. Cette période n'a donc pas été incluse dans l'analyse statistique. En ce qui touche l'analyse des effets du génotype sur la lactation, les variables suivantes ont aussi été analysées : la production laitière quotidienne, la composition du lait (les protéines totales, les caséines totales, le gras, le lactose, le nombre de cellules somatiques), la composition des fractions protéiques du lait soit la fraction caséine (caséines  $\alpha$ s1,  $\alpha$ S2,  $\beta$  et kappa), et le lactosérum (l' $\alpha$ -lactalbumine, la  $\beta$ -lactoglobuline, la BSA et les immunoglobulines). Les variables de production sur 305 jours, protéines et gras totaux, ont été utilisés lors de l'analyse de l'effet du génotype sur 3 lactations. Ces variables ont été analysées en rapport avec les facteurs suivants : le génotype d'expression (homozygote et hétérozygote), le stade de lactation, le génotype de la caséine  $\beta$  et le génotype de la  $\beta$ -lactoglobuline. Tour à tour pour chacun des trois facteurs d'intérêt (le phénotype d'expression homozygote, hétérozygote (GÉNOTYPE), le variant génétique de la  $\beta$ -lactoglobuline (VG\_BLG) et le variant génétique de la caséine  $\beta$  (VG\_BETA)) et pour chaque effet du temps séparément (STADE1 et STADE2), l'analyse de la variance a été exécutée sur l'ensemble des mesures disponibles selon un plan complètement aléatoire en mesures répétées avec l'effet du facteur comme source principale de variabilité et l'effet du temps et de son interaction avec le facteur principal comme autres sources de variabilité possible. Il y a donc 9 analyses pour chaque variable à l'étude dans les données récoltées selon les 11 jours de test. Les mesures sur la production sur trois lactations en fonction de la lactation (équivalent à la parité des vaches) ont été analysées selon un plan complètement aléatoire

en mesures répétées sur le numéro de lactation avec les mêmes trois facteurs d'intérêt, résultant en 3 analyses distinctes pour chaque variable.

Voici la formule utilisée par le modèle :

$$Y_{ijk} = \mu + \text{facteur}_i + \text{vache}_j(i) + \text{temps}_k + (\text{facteur} * \text{temps})_{ik} + e_{ijk}$$

où :

$\mu$  = moyenne générale

facteur  $i$  = effet fixe du facteur expérimental

Génotype,  $i$  = HH, HL

VG\_BLG,  $i$  = aa, ab, bb

VG\_beta,  $i$  = a1a1, a1a2, a1b, a2a2, a2b

Vache  $j(i)$  = effet aléatoire de la vache  $j$  (erreur expérimentale)

temps  $k$  = effet du temps  $k$  :

Jour de test,  $k=1, *, 11$

Stade 1,  $k=1, *, 4$

Stade2,  $k=1, *, 11$

Saison,  $k=1, *, 4$ . ggg

(facteur\*temps)  $ik$  = effet du facteur expérimental  $i$  au temps  $k$ .

$e_{ijk}$  = erreur aléatoire de la mesure de la vache  $j$  au temps  $k$  (erreur résiduelle).

## Chapitre III

### 3 RÉSULTATS

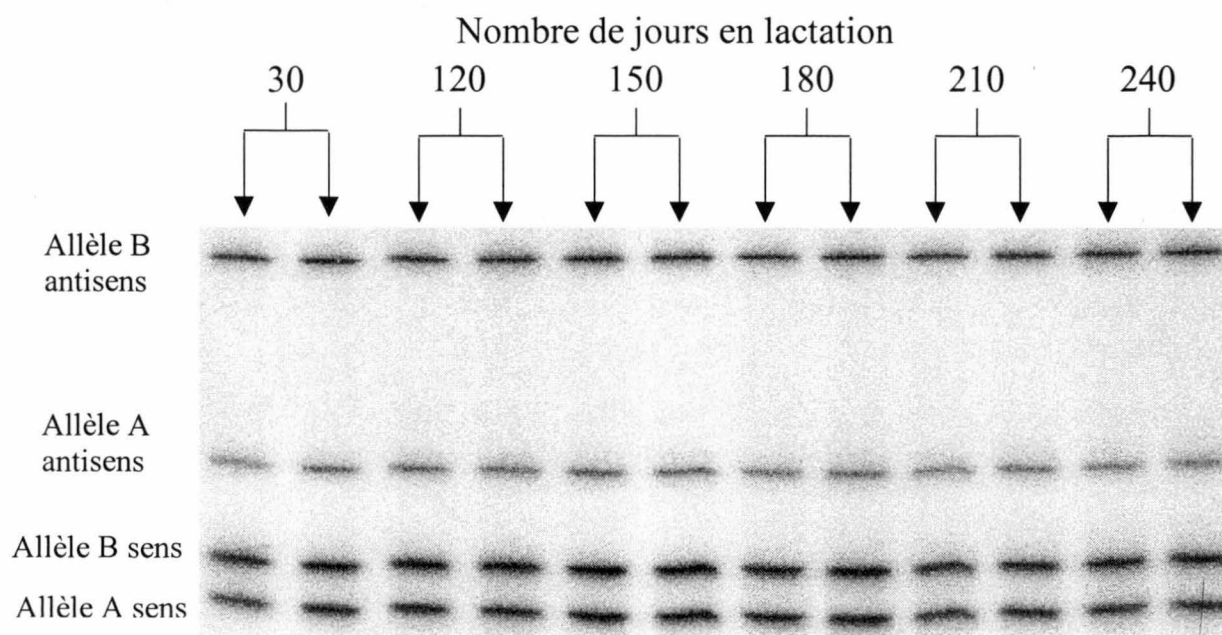
Ce projet de recherche repose sur l'hypothèse suivante à savoir que le polymorphisme d'expression du gène de la caséine kappa, observable chez certaines vaches hétérozygotes AB, ne serait pas affecté par le stade de lactation et il pourrait exercer une influence sur la composition du lait. Pour vérifier cette affirmation, nous avons procédé à l'analyse du niveau d'expression de chaque allèle de la caséine kappa chez un groupe de vaches hétérozygotes AB pour ce gène. Nous avons ensuite analysé une partie des échantillons de lait ayant servi à l'extraction d'ARN pour vérifier si l'expression différentielle du gène de la caséine kappa avait une influence en terme de composition globale du lait et plus particulièrement sur la composition de la fraction protéique du lait, une analyse faite par HPLC.

#### 3.1 Quantification de l'allèle B au cours d'une lactation

Dans le but d'étudier le niveau d'expression de l'allèle B de la caséine kappa, nous avons utilisé des vaches hétérozygotes AB pour ce gène. Le fait que ces animaux soient hétérozygotes nous a permis de définir deux populations au niveau de l'expression de l'allèle A : une première où le taux d'expression est équivalent à celui de l'allèle B (groupe 1) et une seconde où le taux d'expression est inférieur à celui de l'allèle B (groupe 2). L'emploi d'animaux hétérozygotes a conséquemment permis l'utilisation d'une référence au niveau de l'expression du gène de la caséine kappa, soit l'allèle B. Pour observer les niveaux d'expression, nous avons utilisé la technique de RT-PCR SSCP. Après la migration des échantillons marqués au  $^{32}\text{P}$  sur un gel de polyacrylamide



en conditions non dénaturantes, l'exposition du gel et le développement du film (autoradiographie), un patron spécifique de bandes a été produit. Les résultats ont été analysés par densitométrie. Un exemple de patron de bandes caractéristique obtenu suite à l'amplification spécifique des ARNm des allèles A et B provenant d'un échantillon d'ARN de la vache 537 par RT-PCR SSCP est présenté sur la figure 6. Les données de densitométrie ont été analysées en comparant l'intensité des bandes, sens et antisens, correspondant à l'allèle A et à l'allèle B dans le but d'obtenir un taux d'expression relatif d'un allèle par rapport à l'autre. Ces résultats ont permis de révéler 2 populations d'animaux. Une population où l'expression des 2 allèles est similaire (groupe 1) et une autre (groupe 2), où l'allèle B est plus exprimé que l'allèle A. Les moyennes des vaches du groupe 1 (n=9) ont été regroupées dans le tableau 2 et les moyennes des vaches du groupe 2 (n=21) ont été regroupées dans le tableau 3.



**Figure 6.** Autoradiographie découlant de l'analyse par SSCP des produits obtenus par RT-PCR. Chaque échantillon a été déposé en duplicata sur le gel.

No. Vache	n*	% d'allèle B	Erreur Standard (%)	Jours de lactation
501	5	51,40	0,90	407
539	6	51,61	1,02	405
613	4	51,00	0,28	167
5090	7	47,25	0,71	274
5094	8	50,98	1,00	345
5103	6	51,64	0,70	341
5112	4	51,81	1,71	387
5133	5	48,51	1,13	431
5139	6	51,61	1,48	383
Moyenne		50,64	0,51	

**Tableau 2.** Moyenne de l'expression de l'allèle B au cours d'une lactation pour les individus du groupe 1 montrant un taux d'expression équivalent des allèles A et B pour la caséine kappa (n=9).

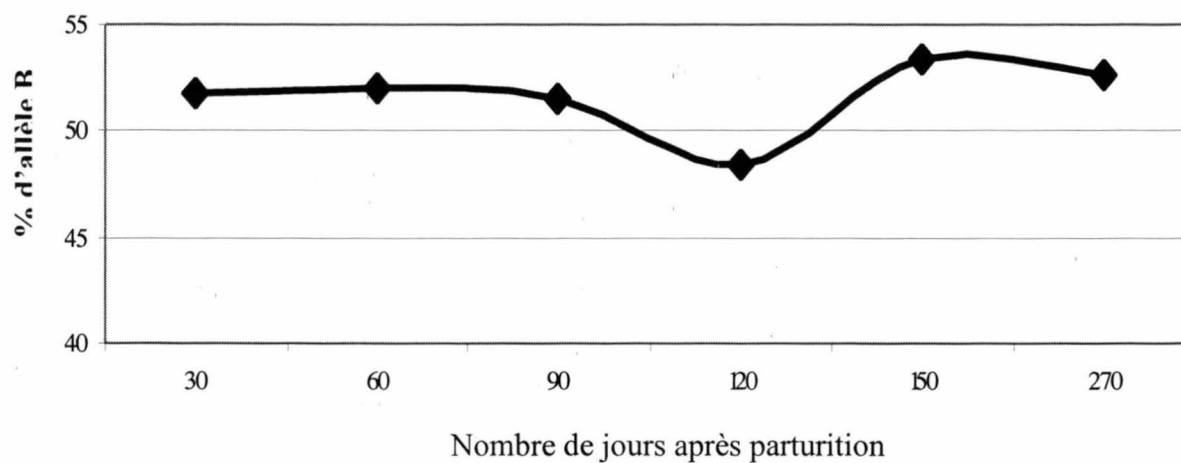
\* n : nombre de mesures effectuées par vache

No. de vache	n*	% allèle B	Erreur Standard (%)	Jours de lactation
341	5	53,56	0,59	181
449	4	54,03	0,33	403
537	6	55,33	0,40	272
603	6	54,01	0,51	415
609	7	53,17	0,60	334
614	7	53,33	0,60	340
634	6	53,05	0,75	310
5033	4	54,58	0,71	328
5047	7	53,07	0,39	360
5068	8	53,30	0,69	340
5070	6	53,74	0,80	311
5091	4	55,22	1,25	190
5106	7	53,38	1,11	301
5114	6	56,43	0,70	279
5115	7	53,25	0,54	326
5118	6	54,36	0,37	233
5121	4	53,46	0,49	258
5127	7	53,62	0,63	341
5130	7	53,28	1,17	345
5149	7	54,84	0,66	290
5161	8	53,88	0,59	> 275
Moyenne		53,95	0,89	

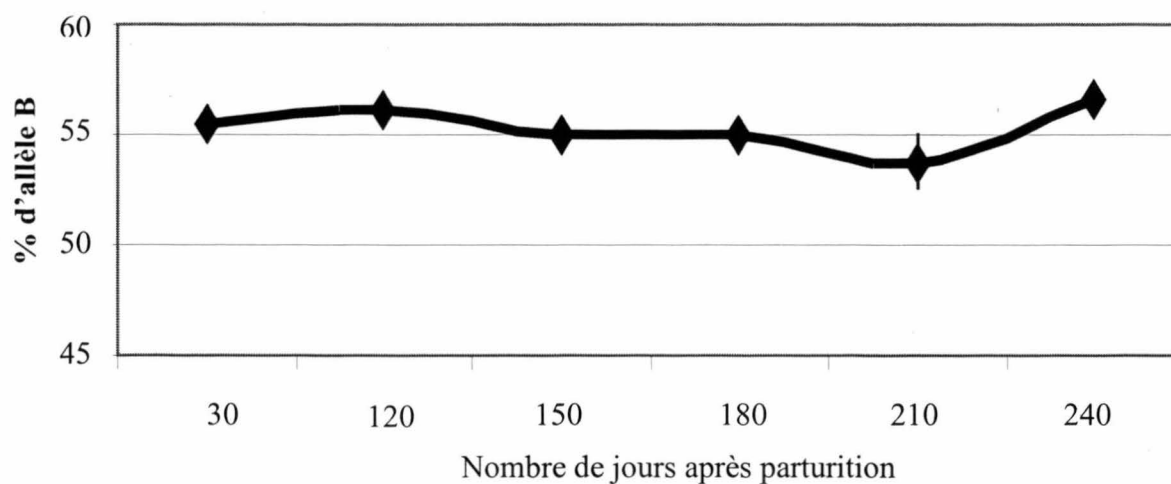
**Tableau 3.** Moyenne de l'expression de l'allèle B au cours d'une lactation pour les individus du groupe 2 montrant un taux d'expression différent des allèles A et B pour la caséine kappa (n=21)

\*n : Nombre de mesures effectuées par vache

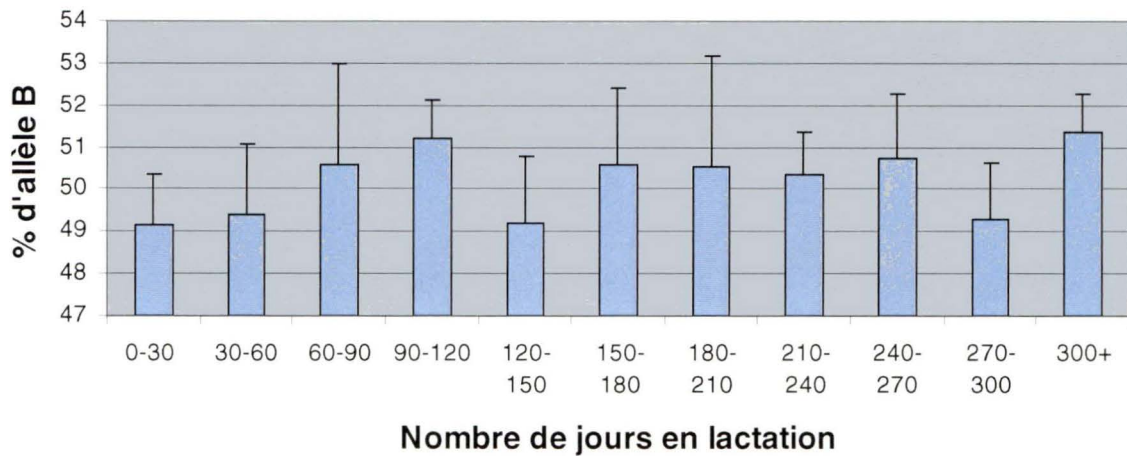
Le niveau d'expression moyen de l'allèle B de la caséine kappa chez les animaux du groupe 1 au cours d'une lactation est de  $50,64\% \pm 0,51\%$  et de  $53,95\% \pm 0,89\%$  pour les vaches du groupe 2. Ces deux groupes d'animaux constituent des populations statistiquement distinctes ( $P < 0,001$ ). Les profils d'expression représentatifs de l'allèle B au cours d'une lactation chez une vache du groupe 1 et du groupe 2 sont présentés aux figures 7 et 8, respectivement. On constate que le taux d'expression relatif de l'allèle B varie peu au cours la période d'investigation, soit 240 jours de lactation pour la vache du groupe 1 et 270 jours pour la vache du groupe 2. Les figures 9 et 10 représentent la somme de toutes les observations effectuées chez les animaux des groupes 1 et 2. Ces observations sont regroupées selon le stade de lactation ( $n = 11$  pour le groupe 1;  $n = 10$  pour le groupe 2). Dans le tableau 4, on retrouve les échantillons de lait ayant servi pour les analyses des protéines par HPLC et pour les extractions des ARNs. Ces échantillons de lait sont répartis selon le jour de test en fonction du stade de lactation. Étant donné que les vaches n'ont pas commencé leur lactation au même mois, on ne retrouve pas le même nombre d'échantillons dans chaque stade de lactation. Lors de l'analyse statistique, la lactation a été séparée en périodes de 30 (Figures 9 et 10) ou de 100 jours (Tableau 4). Les résultats se sont avérés identiques peu importe l'intervalle de comparaison. Le niveau d'expression des ARNm B spécifiques ne varie pas significativement ( $P < 0,25$ ) au cours de la lactation. Pour le groupe 1, ce niveau se situe autour de 50% et pour le groupe 2, il tend à se centrer autour de 54%.



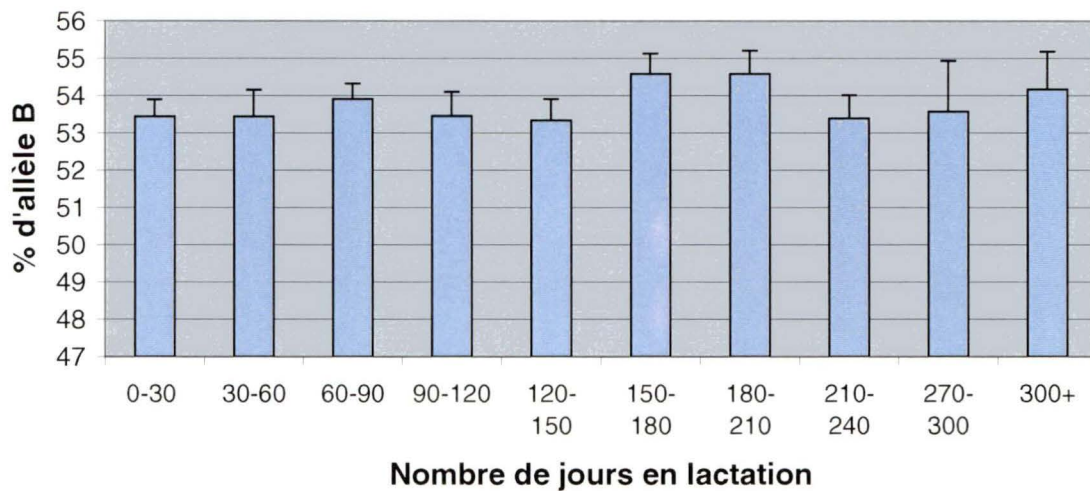
**Figure 7.** Proportions relative d'ARNm provenant de l'allèle B de la caséine kappa à différents stades de lactation pour la vache # 5103 (groupe 1).



**Figure 8.** Proportions relative d'ARNm provenant de l'allèle B de la caséine kappa à différents stades de lactation pour la vache # 537 (groupe 2).



**Figure 9.** Variations de l'expression de l'allèle B du gène de la caséine kappa au cours d'une lactation chez des individus du groupe 1. Les différentes bandes correspondent à la moyenne observée de toutes les vaches du groupe 1 (n=9) faisant partie de l'étude à différents stades de lactation.



**Figure 10.** Variations de l'expression de l'allèle B du gène de la caséine kappa au cours d'une lactation chez les individus du groupe 2. Les différentes bandes correspondent à la moyenne observée de toutes les vaches du groupe 2 (n=21) faisant partie de l'étude à différents stades de lactation.

Jour de test	Stade de lactation (jours)				Total
	1-100	101-200	201-300	300 et +	
1- (11/10/98)	22	1	6	0	29
2- 26/11/98)	20	1	5	0	26
3- (12/01/99)	20	8	1	5	34
4- (09/02/99)	7	21	0	5	33
5- (09/03/99)	6	23	1	5	35
6- (09/04/99)	2	24	3	5	34
7- (12/05/99)	2	9	14	0	25
8- (10/06/99)	2	6	17	0	25
9- (17/09/99)	2	3	5	7	17
10- (18/10/99)	2	1	2	5	10
Total des observations	85	97	54	32	268
% du total	31,72	36,19	20,15	11,94	100

**Tableau 4.** Répartition des échantillons de lait recueillis en fonction du stade de lactation et du jour de test. Les stades de lactations sont ici séparés en périodes de 100 jours.

### 3.2 Impact de l'expression différentielle allèle spécifique de la caséine kappa sur la production laitière et la composition du lait

Pour pouvoir observer l'impact du phénotype d'expression du gène de la caséine kappa sur la composition laitière, les échantillons de lait recueillis ont été soumis à diverses analyses. Pour chaque échantillon, nous avons mesuré les teneurs en protéine brute et en caséines, la composition fine de la fraction caséine et de la fraction soluble après précipitation acide, le lactosérum. Certaines données de production et de composition du lait (la production quotidienne de lait, la quantité de protéines brutes, la proportion de gras, la concentration de lactose et le nombre de cellules somatiques) proviennent des analyses effectuées par le Programme d'Analyse des Troupeaux Laitiers

du Québec (PATLQ). Le modèle statistique utilisé pour l'analyse de l'effet de l'expression différentielle des allèles est décrit à la section 2.9. L'effet de l'expression différentielle a été observé pendant toute une lactation. Cette dernière a été séparée en périodes de 100 jours ( $n = 4$ ) (Stade 1) et en périodes de 30 jours ( $n=11$ ) (Stade 2). Les effets dus à l'expression différentielle des allèles sur les différentes variables sous étude, et ce pour chaque effet de temps (Stade 1 et Stade 2), se sont avérés très similaires. Conséquemment, nous limiterons la présentation des résultats obtenus avec le classement en périodes de 30 jours, sauf pour le tableau 4, où les résultats sont présentés selon le stade 1.

### **3.2.1 Lait entier**

Les analyses de composition ont été menées au cours d'une année sur une base mensuelle. Les effets du taux d'expression différentiel des allèles et du stade de la lactation sur la production laitière et la composition du lait sont présentés au tableau 5 (les statistiques sont présentées dans les colonnes 4 à 6). Les individus du groupe 1 démontrent une plus grande production journalière de lait, de lactose, de caséines totales et de protéines totales. Cependant, l'expression différentielle des allèles agit de façon significative au niveau du lactose seulement. Le groupe 2 semble avoir un plus grand nombre de cellules somatiques mais ce n'est pas significatif. Le stade de la lactation affecte significativement la production laitière, les caséines totales et les protéines totales ( $P < 0,001$ ) ainsi que le taux de protéines ( $P < 0,003$ ). Le pourcentage de caséine, le gras et le nombre de cellules somatiques ne varie pas significativement en fonction du stade de lactation. L'expression différentielle des allèles n'affecte pas les paramètres principaux de composition du lait (protéines, gras, production de lait) au cours de la lactation. De



plus, il n'y a aucune interaction entre l'expression différentielle des allèles et le stade de lactation et ce pour toutes les variables.

	Taux d'expression des allèles		Niveau de probabilité		
Variables	Groupe 1	Groupe 2	Expression différentielle <sup>♣</sup>	Stade 2 <sup>♠</sup>	Expression différentielle- Stade 2 <sup>♥</sup>
Lait (kg/jour)	28,685	26,327	0,2508	< 0,0001	0,1593
Protéine (g/100 ml)	3,339	3,298	0,7688	< 0,0030	0,9587
Caséine (g/100 ml)	2,720	2,649	0,5822	< 0,0472	0,9652
Gras (g/100ml)	3,843	4,015	0,4675	0,1651	0,0970
Lactose (g/100 ml)	4,727	4,578	0,0332	0,0524	0,1951
Cellules somatiques (10 <sup>5</sup> cellules/ml)	3,853	4,682	0,0446	0,3431	0,6502
Caséine (%)	80,238	80,055	0,8390	0,1382	0,8289
Caséines totale (kg/ lactation)	388,697	366,717	0,4186	< 0,0001	0,9375
Protéines totales (kg/ lactation)	475,596	456,156	0,5573	< 0,0001	0,8968

**Tableau 5.** Effets de l'expression différentielle sur les variables de production et de composition du lait au cours de la lactation.

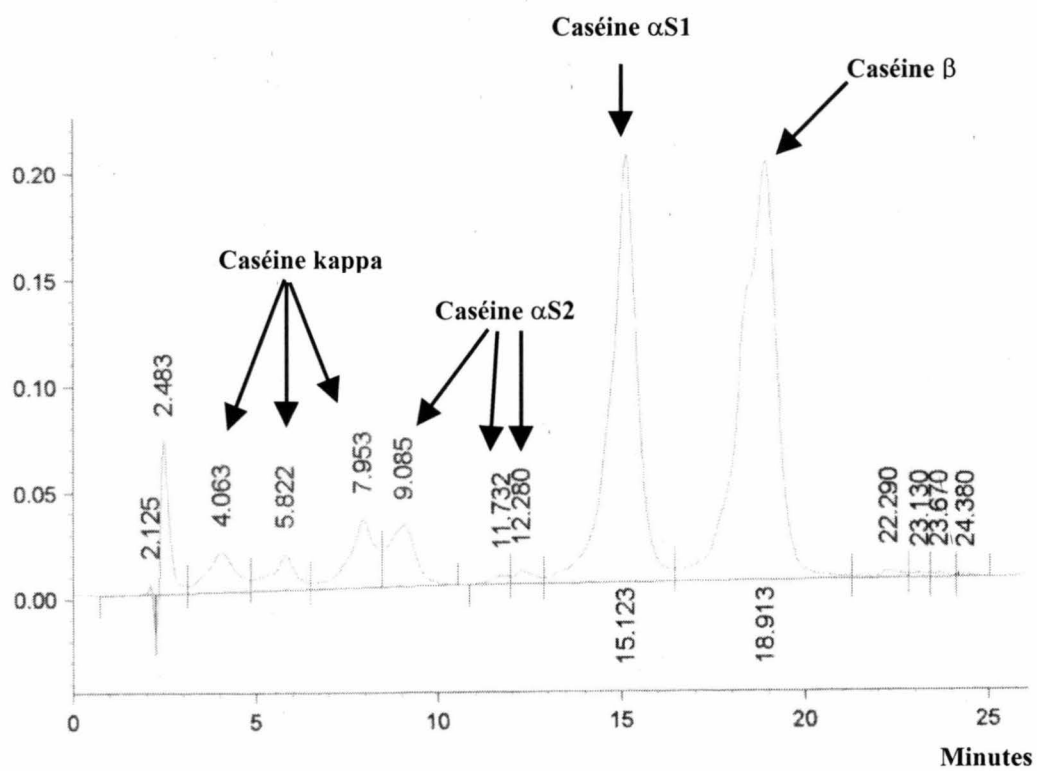
♥ : Effet l'expression différentielle des allèles sur les variables étudiées

♠ : Effet du stade de lactation sur les variables étudiées

♣ : Interaction entre l'expression différentielle et le stade de lactation

### 3.2.2 Impact sur la composition de la fraction caséine

Tous les échantillons ont été traités tel que décrit dans la section 2.3, puis analysés par HPLC dans le but de déterminer si la composition protéique du lait des vaches était influencée par l'expression différentielle des allèles. On peut observer sur la figure 11 un profil de HPLC typique pour les caséines bovines ( $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2,  $\beta$  et kappa). Les proportions moyennes des caséines sont regroupées dans le tableau 6 pour les deux groupes de vaches. Les vaches du groupe 1 semblent démontrer une proportion légèrement supérieure de caséine  $\beta$ , tandis que les vaches du groupe 2 possèdent de plus grandes proportions de caséine  $\alpha$ S1 et  $\alpha$ S2. Ces différences ne sont toutefois pas significatives ( $P < 0,6$ ). Encore une fois, l'expression différentielle des allèles n'a pas d'influence sur les proportions étudiées. Le stade de lactation n'a pas d'effet sur les caséines  $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2 et  $\beta$ . Il semble, par contre, y avoir une tendance se dessinant au niveau de la caséine kappa ( $P < 0,08$ ) mais il s'agit d'un effet du stade de lactation et non du taux d'expression différentiel des allèles ( $P > 0,16$ ). On ne dénote aucune interaction entre le stade de lactation et l'expression différentielle des allèles.



**Figure 11.** Profil de HPLC typique pour les caséines du lait bovin selon la méthode de Visser et al., (1991)

Variables	Taux d'expression des allèles		Niveau de probabilité		
	Groupe 1	Groupe 2	Expression différentielle	Stade 2	Expression différentielle- Stade 2
Caséine $\alpha$ S1 (%)	33,842	34,186	0,6013	0,1031	0,4818
Caséine $\alpha$ S2 (%)	10,333	10,618	0,6491	0,2816	0,2329
Caséine $\beta$ (%)	40,130	39,853	0,5999	0,1005	0,1490
Caséine $\kappa$ (%)	15,851	15,273	0,1635	0,078	0,7260

**Tableau 6.** Proportions moyennes des caséines obtenues à partir des échantillons de lait de toutes les vaches faisant partie de l'étude. Les moyennes ont été calculées avec les données recueillies pendant toute une lactation.

### 3.2.3 Impact sur la composition de la fraction lactosérum

Une portion de chaque échantillon de lait ayant servi à l'analyse des caséines a aussi été utilisée pour doser les protéines du lactosérum ( $\alpha$ -lactalbumine et  $\beta$ -lactoglobuline) par HPLC. Les valeurs moyennes ont été regroupées selon l'expression différentielle des allèles; les données apparaissent au tableau 7 pour les vaches du groupe 1 et du groupe 2. Le groupe 2 possède une proportion moyenne de  $\beta$ -lactoglobuline légèrement plus élevée tandis que l'on observe une plus grande quantité d' $\alpha$ -lactalbumine chez le groupe 1. Les proportions de BSA et d'Ig sont à toute fin pratique équivalentes. L'analyse a démontré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes de vaches au niveau de tous les paramètres. Les facteurs « expression différentielle » et « stade de lactation » n'ont pas d'influence sur les proportions des composantes majeures du lactosérum ( $P > 0,1$ ). Aucune interaction entre les deux facteurs n'a pu être démontrée sauf dans le cas des Ig ( $P < 0,0002$ ).

Variables	Taux d'expression		Niveau de probabilité		
	Groupe 1	Groupe 2	Expression différentielle	Stade 2	Génotype-Stade 2
$\beta$ -lactoglobuline (%)	70,239	71,755	0,3517	0,5629	0,9944
$\alpha$ -lactalbumine (%)	22,326	21,183	0,3403	0,3546	0,9794
BSA (%)	4,827	4,703	0,210	0,6130	0,1996
Ig (%)	2,522	2,440	0,166	0,6745	0,0002

**Tableau 7.** Proportions moyennes de la  $\beta$ -lactoglobuline et le l' $\alpha$ -lactalbumine obtenues à partir des échantillons de lait de toutes les vaches faisant partie de l'étude. Les moyennes ont été calculées avec les données recueillies pendant toute une lactation.

### **3.3 Influence de l'expression différentielle des allèles du gène de la caséine kappa, des variants génétiques de la $\beta$ -lactoglobuline et de la caséine bêta sur la production et la composition du lait produit sur plusieurs lactations**

Nous avons effectué une analyse statistique sur les trois premières lactations de chaque vache. Trois paramètres ont été privilégiés lors de l'analyse de la production des vaches faisant partie de l'étude: la quantité de gras, la production de lait et la quantité de protéines. Ces variables ont été analysées en fonction de différents facteurs pouvant avoir une influence sur la production de lait et la composition de ce dernier : l'expression différentielle des allèles du gène de la caséine kappa, le génotype de la  $\beta$ -lactoglobuline et le génotype de la caséine  $\beta$ .

#### **3.3.1 Impact du taux d'expression des allèles**

Nous voulions observer les effets du taux d'expression des allèles sur la production laitière des vaches et ce, sur une période couvrant plus d'une lactation. Les résultats d'analyse sont présentés dans le tableau 8. On observe que les vaches du groupe 1 produisent plus de gras, de lait et de protéines dans des proportions allant de 7,6% à plus de 8,6%. L'analyse statistique démontre cependant que le taux d'expression des allèles n'affecte pas la production laitière de façon significative ( $P > 0,1$ ). Par contre le numéro de lactation, c'est-à-dire le nombre de lactation d'une vache (paramètre aussi désigné sous le nom de parité), a une influence sur la production de gras ( $P < 0,01$ ), de lait ( $P < 0,003$ ) et de protéines ( $P < 0,006$ ). On note cependant qu'il n'y a aucune interaction entre l'expression différentielle et le nombre de lactation, sauf pour la production de gras où on observe une faible tendance ( $P < 0,1$ ).

Variables	Taux d'expression		Différence (%)	Niveau de probabilité		
	Groupe 1	Groupe 2		Expression différentielle (P)	NOlact' (P)	Expression différentielle_NoLact** (P)
Gras (kg)	333,68	304,82	8,649	0,2825	0,001	0,097
Lait (kg)	8605,77	7947,97	7,644	0,2435	0,003	0,230
Protéines (kg)	282,12	256,80	8,975	0,1664	0,006	0,323

**Tableau 8.** Influence de l'expression différentielle des allèles sur la production laitière moyenne des vaches faisant partie de l'étude lors de leurs trois premières lactations. La production a été normalisée à 305 jours.

\* NoLact : numéro de lactation (parité)

\*\* Expression différentielle\_NoLact : interaction entre l'expression différentielle et le numéro de lactation

### 3.3.2 Influence des variants génétiques de la bêta-lactoglobuline

Il a été démontré à plusieurs reprises que le génotype de la  $\beta$ -lactoglobuline avait des effets sur la composition du lait et sur les paramètres de production (Ojala et al., 1997; Lundén et al., 1997; Bobe et al., 1999). Les résultats de notre analyse sont résumés au tableau 9. Les vaches de génotype AA démontrent la plus grande production de gras (324,74 kg) tandis que l'on observe la plus grande quantité de lait et de protéines chez les vaches de génotype AB (8169 kg et 262,63 kg respectivement). Le génotype seul n'a donc pas d'effet au niveau des paramètres étudiés ( $P > 0,1$ ). Le stade de lactation, par contre, a une influence sur ces derniers. On peut aussi constater une interaction entre le génotype et le stade de lactation pour la production de protéines ( $P < 0,023$ ) ainsi qu'une tendance au niveau de la production de lait ( $P < 0,052$ ).

Variables	Génotype de la $\beta$ -lactoglobuline			Niveau de probabilité		
	AA	AB	BB	Vg $\beta$ -lac* (P)	NOlact** (P)	Génotype_NOlact*** (P)
Gras (kg)	324,74	308,14	289,19	0,6290	0,024	0,404
Lait (kg)	7762,67	8169,73	7656,64	0,6440	0,017	0,052
Protéines (kg)	253,14	262,63	255,14	0,8711	0,017	0,023

**Tableau 9.** Influence du génotype de la  $\beta$ -lactoglobuline sur la production laitière moyenne des vaches faisant partie de l'étude lors de leurs trois premières lactations. La production a été normalisée à 305 jours.

\* Vg  $\beta$ -lac : variant génétique de la  $\beta$ -lactoglobuline

\*\* NOlact : numéro de lactation (parité)

\*\*\* Génotype\_NOlact : interaction entre le génotype et le numéro de lactation



### 3.3.3 Influence des variants génétiques de la caséine bêta

Le dernier facteur étudié en rapport avec la production laitière échelonnée sur plusieurs lactations consécutives est le génotype de la caséine- $\beta$ . Cinq génotypes étaient présents dans le troupeau des vaches étudiées : A1A1, A1A2, A1B, A2A2 et A2B. Le génotype A2B est celui associé avec la plus grande production de gras tandis que les productions de lait et de protéines optimales sont associées au génotype A1B. Selon l'analyse, le génotype de la caséine  $\beta$  seul n'a pas d'influence sur les trois variables étudiées ( $P > 0,2$ ). On observe que le numéro de lactation ainsi que l'interaction entre ce dernier et le génotype sont significatifs pour les paramètres de production de gras ( $P < 0,012$ ), de lait ( $P < 0,009$ ) et de protéines ( $P < 0,0004$ ).

Variables	Génotype de la caséine bêta					Niveau de probabilité		
	A1A1	A1A2	A1B	A2A2	A2B	Vg caséine $\beta^*$ (P)	NoLact** (P)	Génotype_NoLact*** (P)
Gras (kg)	293,05	297,73	302,74	270,26	321,26	0,8027	0,004	0,012
Lait (kg)	8203,46	7372,62	8415,61	7331,68	8151,02	0,4546	0,008	0,009
Protéines (kg)	273,34	239,25	275,46	227,20	260,22	0,2644	0,002	0,0004

**Tableau 10.** Influence du génotype de la caséine  $\beta$  sur la production laitière moyenne des vaches faisant partie de l'étude lors de leurs trois premières lactations. La production a été normalisée à 305 jours.

\* Vg caséine  $\beta$  : variant génétique de la caséine  $\beta$

\*\* NoLact : numéro de lactation

\*\*\* Genotype\_NoLact : interaction entre le génotype et le numéro de lactation

## Chapitre IV

### 4 DISCUSSION

#### 4.1 Niveau d'expression allèle spécifique du gène de la caséine kappa

Dans la présente étude, nous avons utilisé la méthode de RT-PCR SSCP développée par Robitaille et Petitclerc (2000) pour évaluer le niveau d'expression du gène de la CN- $\kappa$  chez les vaches hétérozygotes AB pour ce gène. Cette technique nous a permis de confirmer l'existence de deux populations d'animaux : un groupe présentant un niveau d'expression similaire pour les deux allèles, et désigné comme étant le groupe 1, et un autre groupe où l'allèle B est le plus exprimé et désigné comme étant le groupe 2. Tel qu'indiqué dans les tableaux 2 et 3, le niveau moyen de l'expression de l'allèle B chez les animaux du groupe 1 est de  $50,64\% \pm 0,51\%$  et de  $53,95\% \pm 0,89\%$  chez les animaux du groupe 2. À prime abord, cette différence peut sembler minime mais elle n'en est pas moins significative ( $P < 0,001$ ), prouvant ainsi que les 2 populations sont réellement différentes. On constate cependant une légère baisse du pourcentage d'allèle B lorsqu'on le compare avec les résultats obtenus dans une étude antérieure réalisée dans notre laboratoire (Robitaille et Petitclerc, 2000). Lors de cette étude, le groupe 2 démontrait un niveau d'expression moyen de  $56,6\% \pm 1,3\%$ . On constatait alors que l'écart entre les 2 groupes était de 6,5% plutôt que de 3,31% dans notre étude. Cette différence ne peut être expliquée par la technique employée puisque les protocoles utilisés pour obtenir les résultats étaient identiques. De plus, même si les vaches faisant partie des deux études n'étaient pas les mêmes pour la plupart, elles faisaient partie du même troupeau. Donc, elles ont été maintenues dans les mêmes conditions et plus particulièrement, soumises à des conditions identiques d'alimentation. Il a été démontré

que ce facteur pouvait influencer la synthèse des protéines du lait et plus particulièrement celle des caséines (Coulon et Rémond, 1991; Choung et Chamberlain, 1992). La seule différence notable et majeure réside dans le fait que les extractions d'ARN, à la base de l'expérience, n'ont pas été effectuées à partir du même matériel. En effet, dans l'expérience de Robitaille et Petitclerc (2000), les purifications d'ARNs ont été réalisées à partir de biopsies de glandes mammaires alors que dans la présente étude, les extractions ont été effectuées à partir de cellules somatiques présentes dans le lait. Dans l'expérience décrite dans ce document, il nous a été impossible de faire des biopsies mensuelles sur chaque animal au niveau de la glande mammaire sans endommager cette dernière et sans en affecter le rendement. La récolte des cellules somatiques du lait a donc été privilégiée pour contourner les dommages irréversibles pouvant être causés à la glande par les biopsies à répétition. Cette méthode peut cependant causer des variations d'échantillonnage car différents facteurs peuvent interférer sur les résultats. Parmi ceux-ci, notons l'état des cellules lors de l'extraction des ARN. Lors des biopsies, le tissu était prélevé et congelé immédiatement. Ce ne fut pas le cas avec les cellules somatiques qui ont séjourné au moins quelques heures dans la glande mammaire, et à température ambiante après la traite, avant d'être lysées pour effectuer l'extraction des ARNs. De plus, on ne connaît pas le niveau d'apoptose des cellules épithéliales mammaires décrochées de la paroi des alvéoles. Il devient donc difficile de contrôler la qualité des ARN ainsi extraits de mois en mois à partir d'une même vache. Malgré tout, pour les individus du groupe 2, l'expression différentielle a toujours été détectable.

## **4.2 Effets du stade de lactation sur le polymorphisme d'expression de la caséine kappa**

Connaissant les effets que peut avoir le stade de lactation sur la production et sur la composition du lait, nous avons voulu savoir si l'expression différentielle était modulée par le stade de lactation. À cette fin, nous avons entrepris une étude étendue sur une lactation complète. Les figures 9 et 10 représentent la somme de toutes les observations effectuées chez les animaux des groupes 1 et 2, respectivement. Ces observations sont regroupées selon le stade de lactation. Ce dernier ne semble pas avoir d'effet sur le phénomène du polymorphisme d'expression de la caséine kappa bovine. Les vaches du groupe 1 maintiennent des niveaux d'expression similaires pour chaque allèle. Ces derniers sont relativement constants tout au long de la lactation (Figure 9). On constate que les animaux du groupe 2 ne sont pas non plus affectés par le stade de lactation (Figure 10). Le niveau d'expression de l'allèle B oscille autour de 54% de l'expression totale du gène durant toute la lactation.

L'analyse statistique démontre effectivement que le niveau d'expression de l'allèle B ne varie pas significativement tout au long de la lactation et ce, autant chez les vaches du groupe 1 que chez les vaches du groupe 2 ( $P > 0,25$ ). On peut constater dans le tableau 4 que les divers stades de lactation ont été couverts par une répartition relativement équivalente des échantillons à l'exception du stade de 300 jours et plus. L'importance de ce déséquilibre est amoindrie par le fait que la durée moyenne d'une lactation est de 305 jours. Les divers échantillons se retrouvent à plus de 88% dans les stades de lactation habituellement considérés pour mesurer les paramètres de production laitière. On peut donc affirmer que les stades de lactation d'importance ont été couverts par cette étude.

### 4.3 Impact des hormones sur l'expression différentielle

Les hormones lactogènes comme la prolactine (PRL) et les glucocorticoïdes agissent de concert pour stimuler des facteurs de transcription responsables de l'expression « hormone-dépendante » des gènes des protéines du lait (Cella et al., 1998). La sécrétion de PRL augmente en début de lactation grâce à un stimulus déclenché par l'allaitement. Elle atteint un pic à huit semaines pour ensuite diminuer graduellement jusqu'à trente-deux semaines. Par la suite, elle n'est plus relâchée dans le sang (Koprowski et Tucker, 1973a). On constate donc que la variation de la concentration de PRL dans le sang des vaches au cours de la lactation n'affecte pas le niveau d'expression du gène de la caséine kappa. La concentration de glucocorticoïdes pendant la lactation est relativement constante une heure après la traite (Koprowski et Tucker, 1973b). L'influence de cette hormone sur la transcription des gènes des caséines, donc sur celui de la caséine kappa, est toutefois plus faible que celui de la prolactine (Welte et al., 1993). De plus, l'association du complexe glucocorticoïde-récepteur (GR) avec Stat5 (phosphorylé par la PRL) résulte en une plus grande activation de la transcription que la somme des effets individuels dus à la PRL et aux glucocorticoïdes (Stöcklin et al., 1996). La sécrétion constante de glucocorticoïdes ne peut compenser pour la diminution de la sécrétion de PRL.

La GH, l'insuline et l'IGF-1 jouent aussi un rôle dans le maintien du niveau d'expression du gène de la caséine kappa. La concentration de GH dans le sang des vaches en lactation diminue graduellement de la quatrième à la quarante-quatrième semaine de lactation. Pendant la même période, la concentration d'insuline augmente de façon linéaire (Koprowski et Tucker, 1973b). Il est maintenant bien accepté que l'effet galactopoïétique de la GH se fasse via l'IGF-1 (Prosser et al., 1991; Sharma et al., 1994).

L'IGF-1 et l'insuline peuvent avoir des activités biologiques similaires grâce à leur homologie de structure et grâce au fait qu'ils sont capables d'interagir chacun avec le récepteur de l'autre (de Pablo et Roth, 1990). On sait aussi qu'ils peuvent stimuler la synthèse d'ADN *in vitro* dans des explants de glande mammaire en lactation (Baumrucker et Stemberger, 1989). Leur effet au niveau du gène de la caséine kappa devrait logiquement être le même, c'est-à-dire l'activation de l'expression du gène. Comme la sécrétion de GH diminue graduellement, la production d'IGF-1 diminue de façon proportionnelle. Cette baisse serait immédiatement comblée par l'augmentation de la concentration d'insuline. L'expression de la caséine kappa ne serait donc pas affectée. Les variations du polymorphisme d'expression pendant la lactation ne peuvent être associées à aucun stade de lactation en particulier. Le niveau de sécrétion des différentes hormones, qui change en fonction du stade de lactation, n'affecterait pas le niveau d'expression du gène de la caséine kappa. L'expression différentielle ne serait donc pas modulée directement par des facteurs de croissance ou des hormones lactogéniques.

La cause de cette expression différentielle doit donc être génétique. Une mutation au niveau de la séquence non-codante d'un des deux allèles pourrait être responsable de l'écart existant entre leur niveau d'expression. Un séquençage des zones non codantes a été entrepris par Robitaille et al., (2002). Plus de 35 polymorphismes de nucléotide simple (SNPs) ont été observés dans la région non-codante en 3' du gène. Il s'est avéré que les SNPs se retrouvant chez les individus du groupe 1 se trouvaient aussi chez les individus du groupe 2. La séquence de l'allèle A présente chez les vaches du groupe 1 était en tout point semblable à la séquence de l'allèle A provenant du groupe 2; la même situation s'applique à l'allèle B. Ces mutations ne peuvent donc pas expliquer le fait que

l'allèle A semble exprimé avec une efficacité moindre que l'allèle B chez les individus du groupe 2. Les mutations récemment trouvées ne semblent donc pas provoquer de défaut dans le mécanisme d'épissage des ARNm comme on peut l'observer chez la chèvre au niveau de certains introns du gène de la CN- $\alpha$ S1 (Martin, 1996; Martin et Leroux, 2000). Un SNP retrouvé ailleurs dans le génome pourrait agir à longue distance. Ce dernier serait possiblement retrouvé au niveau d'un enhancer ou encore au niveau d'un élément cis, situé dans le promoteur d'un autre gène de caséine qui ferait indirectement augmenter l'expression du gène de la caséine  $\kappa$ . Rappelons à ce propos que les gènes des caséines se retrouvent dans une courte région du chromosome 6 chez les bovins et que leur expression est coordonnée. À la limite, l'élément responsable de la surexpression du gène de la caséine  $\kappa$  pourrait aussi causer, dans une certaine mesure, une surexpression des gènes codant pour les autres caséines.

La possibilité qu'une mutation soit située près d'un site de reconnaissance d'un facteur de transcription au niveau du promoteur ne doit pas être rejetée : un site de reconnaissance de STAT5 par exemple. Une mutation dans ce type de site, ou encore située à proximité, pourrait affecter l'efficacité de liaison avec le facteur de transcription. L'association entre une mutation retrouvée au niveau du promoteur de la caséine  $\kappa$  et le groupe de vaches hétérozygotes d'expression pourrait peut-être expliquer, du moins en partie, le phénomène de l'expression différentielle. Le séquençage du promoteur du gène de la caséine kappa bovine semble être une avenue propice à des investigations futures.



#### **4.4 Influence du taux d'expression des allèles sur la production, la composition du lait et les protéines du lactosérum**

Un des buts de cette étude était de voir si le phénomène d'expression différentielle du gène de la caséine kappa avait une influence sur la composition du lait et ce, tant au niveau des lactoprotéines (caséines et protéines du lactosérum) qu'au niveau des composantes non-protéiques et d'importance moindre au niveau de l'industrie de la transformation (nombre de cellules somatiques, gras, lactose, BSA et Ig). On observe de nombreuses différences dans la composition du lait entre les deux groupes de vaches (Tableau 5). Les différences les plus importantes se retrouvent au niveau de la production laitière. Le groupe 1 produit 2,36 kgs de lait par jour de plus que le groupe 2. Le groupe 1 démontre aussi une plus grande production de caséines totales (21,9 kgs/ lactation) et de protéines totales (19,4 kgs/ lactation). Comme la transcription des deux allèles de la caséine  $\kappa$  est optimale chez le groupe 1, il serait logique de retrouver plus de caséines et de protéines totales dans leur lait. Malheureusement, ces différences ne sont pas significatives ( $P > 0,25$ ), car les variations observées pour les moyennes des deux groupes étaient trop importantes. Le nombre limité de vaches incluses dans notre étude est sans doute aussi responsable de cette trop grande variation entre les individus. Le fait est que nous n'avons pas pu travailler avec les groupes extrêmes, c'est-à-dire avec un groupe où les deux allèles étaient exprimés de façon optimale et un autre où les deux allèles étaient sous exprimés. Dans ce contexte, nous aurions pu mettre en lumière des différences intéressantes et significatives. Ces deux facteurs nous ont probablement aussi empêché de pouvoir observer des différences entre les deux groupes au niveau des protéines du lactosérum. On peut observer les proportions de ces protéines dans le tableau 7. Comme dans le cas des paramètres de production, il n'y aucune différence significative

entre les deux populations d'animaux. Il semble que l'expression différentielle des allèles de la caséine kappa n'ait pas d'influence sur la concentration des protéines du lactosérum. Contrairement au taux d'expression des allèles, le stade de lactation a une influence sur certaines variables : le lactose ( $P < 0,5$ ), la production de lait journalière ( $P < 0,0001$ ), les protéines ( $P < 0,003$ ), les caséines totales ( $P < 0,0001$ ) et les protéines totales ( $P < 0,0001$ ). Il est relativement facile d'expliquer ce phénomène puisque la production de lait diminue au fur et à mesure que la lactation avance, le nombre de cellules alvéolaires diminue graduellement dans la glande mammaire ce qui fait chuter la production de lait et de ses constituants (Hurley, 1989; Olivier et Sordillo, 1989).

#### **4.5 La caséine kappa et les proportions des caséines**

Au début de cette étude, nous avons émis l'hypothèse que les vaches faisant partie du groupe 2 produiraient plus de caséine kappa B; l'allèle A étant exprimé avec moins d'efficacité chez ces individus, la synthèse du variant A devrait aussi être moins élevée que celle du variant B. Grâce à la technique de HPLC, nous étions aussi en mesure de voir si le polymorphisme d'expression avait une influence sur la proportion des autres caséines. Le tableau 5 montre les proportions moyennes de chaque caséine pour les deux groupes. Force est de constater qu'il n'y a aucune différence entre les deux populations et ce, pour tous les types de caséine. La différence de 3,31% entre le niveau d'expression moyen des ARNm de l'allèle A et de l'allèle B de la caséine kappa observée dans la présente étude ne se répercute donc pas au niveau protéique. Robitaille et Petitclerc (2000) avaient observé une différence de 3,8% au niveau du contenu en variant B de la caséine kappa entre les deux groupes en faveur du groupe 2. Ces résultats confirmaient aussi la tendance voulant que le lait des animaux hétérozygote AB pour le gène de la

caséine kappa contienne une plus grande porportion du variant B de la protéine (Van Eenennaam et Medrano, 1991). La caséine kappa est une protéine hétérogène qui est difficile à doser par HPLC à cause de ses nombreux patrons de glycosylation (Robitaille et al., 1991). Comme le montre la figure 11, ces patrons donnent des profils avec de nombreux signaux associées à la caséine kappa. Ces derniers peuvent parfois se superposer à des pics correspondant à d'autres caséines (chevauchement des pics de la caséines kappa avec ceux de la caséine  $\alpha$ S2 par exemple). Ce phénomène peut mener à une mauvaise évaluation des proportions de caséine kappa et  $\alpha$ S2. Un autre facteur pouvant influencer les proportions des différentes caséines est le laps de temps pendant lequel les échantillons ont séjourné à la température ambiante. Lors de la traite, les différents échantillons ne sont évidemment pas tous recueillis simultanément. Nous n'avions aucun contrôle sur la température de ces échantillons avant la fin de la traite effectuée par un technicien. Tout dépendant de la durée de cette dernière, il est fort probable que certains échantillons de lait aient subi de la dégradation, venant ainsi fausser les proportions des caséines. Le fait qu'une vache soit victime d'une mammite sous-clinique peut également interférer avec les résultats. La destruction du tissu épithélial mammaire par les bactéries va amener le relâchement de diverses protéases, dont la plasmine (Auldist et al., 1996) qui vont partiellement dégrader les caséines. Un compte cellulaire élevé va diminuer le taux de synthèse des caséines (Ballou et al., 1995) ce qui va inévitablement faire baisser le rapport caséines vs protéines totales (Coulon et al., 1998a,b). Tous ces facteurs peuvent masquer l'effet réel de l'expression différentielle des allèles sur la composition en caséine du lait. Il est donc difficile d'observer si l'expression différentielle a un impact sur la quantité de caséine kappa mais aussi sur les proportions des autres caséines.

#### **4.6 Impact de l'expression différentielle des allèles sur la production et la composition du lait produit sur plusieurs lactations**

Lors de l'analyse statistique, nous avons vérifié s'il y avait une différence significative au niveau de la production laitière après plusieurs lactations entre le groupe 1 et le groupe 2. Les trois premières lactations de chaque vache ont donc été analysées selon les paramètres de gras, de production de lait et de protéines. On constate tout d'abord que le numéro de lactation a une influence sur les diverses variables. Les données sont montrées dans le tableau 8. Cette observation est facilement justifiable par le fait que la production augmente dûe au meilleur développement de la glande mammaire chez les vaches lors de la deuxième et de la troisième lactation en comparaison avec la première. La capacité de production des vaches s'en trouve donc augmentée. Cette augmentation de production a déjà été rapportée pour les premières lactations (4 et moins) (Coulon et al., 1998a). Statistiquement, il n'y a aucune différence entre les deux populations de vaches; la variation observable chez les deux groupes d'animaux étant trop grande pour que cette différence soit significative. Cependant, lorsque l'on regarde les moyennes des deux groupes au niveau des quantités de protéines et de lait produites, on observe une différence de 25,32 kg (8,9 %) et de 657,8 kg (7,6%) respectivement, en faveur des animaux du groupe 1. On ne peut pas non plus parler de tendance dans ce cas ci. Par contre, dans le cas de la production de gras, il y a une tendance ( $P < 0,1$ ) voulant qu'une interaction entre l'expression différentielle et le numéro de lactation amène une plus grande production de lait chez les vaches du groupe 1 (28,86 kg ou 8,9%). L'analyse statistique a pu être faussée par le fait que les deux populations ne comportaient pas un nombre égal d'individus (9 vaches pour le groupe 1 contre 21 pour le groupe 2). La variance en a sûrement été affectée empêchant ainsi les différences, au niveau des

variables étudiées, d'être considérées comme étant significativement différentes. En se basant sur les données du tableau 5 pour les caséines pour une lactation et la quantité de lait produite par jour, on peut comparer les rendements laitiers de deux troupeaux fictifs de 50 vaches, un homozygote et un autre hétérozygote. Le troupeau possédant deux allèles de la caséine kappa étant exprimés de façon optimale produirait 1099 kgs de caséine plus par lactation et 117,9 kgs de lait de plus par jour. On peut facilement imaginer l'avantage que cela pourrait amener aux producteurs laitier.

#### **4.7 Influence du génotype de la $\beta$ -lactoglobuline et de la caséine bêta sur la production et la composition du lait pendant plusieurs lactations**

Il est connu que le génotype de la  $\beta$ -lactoglobuline a une influence sur la composition du lait bovin (Ojala et al., 1997; Lundén et al., 1997; Bobe et al., 1999). L'analyse de ce génotype nous a permis de déterminer le niveau de variation engendré par ce facteur sur les divers paramètres étudiés. Nous avons pris en considération les paramètres de gras, de production moyenne de lait et de protéines. En excluant de cette analyse la classification établie à partir de la proportion d'allèle B de la caséine kappa, nous sommes en mesure de déterminer si cette variable influence ou non les résultats. Les résultats du tableau 9 montrent les moyennes obtenues pour les différents génotypes de la  $\beta$ -lactoglobuline au cours des trois premières lactations. Encore une fois, le génotype n'a pas d'influence significative sur les trois facteurs étudiés. Il a été constaté dans d'autres études que la présence de l'allèle B de la  $\beta$ -lactoglobuline était associée à une plus faible quantité de protéines dans le lait (Coulon et al., 1998b) et à une plus faible production de lait (Bovenhuis et al., 1992). Le petit nombre de vaches incluses dans notre étude nous empêche toutefois de confirmer ces résultats. On peut toutefois noter que le numéro de

lactation a une influence significative sur la production. On constate aussi qu'il y a une interaction entre le génotype et les variables de production de lait ( $P < 0,05$ ) et de protéines ( $P < 0,03$ ). Les raisons de cette influence ont été discutées dans la section discutant de la production laitière au cours de plusieurs lactations.

Il a été démontré à plusieurs reprises que le génotype de la caséine  $\beta$  avait une influence sur la composition du lait (Bovenhuis et al., 1992; Lundén et al., 1997; Ojala et al., 1997). Nous avons voulu vérifier si cette influence pouvait interférer avec l'effet attendu du génotype d'expression. Nous avons donc procédé à l'analyse de l'effet causé par la CN- $\beta$ . Les données présentées dans le tableau 10 montrent que les différents génotypes de la CN- $\beta$  présents chez les vaches faisant partie de l'étude n'ont pas d'influence sur la production de lait. Il est cependant surprenant de constater que les moyennes pour la quantité de gras varient de 270,26 kgs pour le génotype A2A2 à 321,26 kgs pour le génotype A2B, soit une différence de plus de 15,8%. Une différence notable existe aussi entre les différents génotypes au niveau des deux autres variables de production. Lorsque l'on s'attarde au niveau de la production de lait, on constate que le génotype produisant le plus de lait est A1B avec 8415,61 kgs, et que celui en produisant le moins est A2A2 avec 7331,68 kgs ce qui donne une différence de 1083,93 kgs ou 12,9%. Du côté de la production de protéines, les génotypes A1B et A2A2 représentent encore une fois les deux groupes extrêmes avec une différence de 48,23 kgs ou 17,5% (275,46 kgs pour A1B et 227,2 kgs pour A2A2). D'autres études ont été menées sur l'influence du génotype de la caséine bêta au niveau de la production du lait (Bovenhuis et al., 1997; Ikonen et al., 1997). Notre analyse a encore une fois été compliquée par le fait que notre population d'étude n'était pas assez grande; avec cinq génotypes différents répartis dans une population de trente vaches, le nombre d'individus dans chaque classe a

été insuffisant pour que nous puissions voir des effets significatifs dûs au génotype. De plus, la trop grande variation à l'intérieur des groupes a rendu les différences observables au niveau des différentes variables de production non significatives.

## CHAPITRE V

### 5 CONCLUSIONS

L'hypothèse qui a donné naissance à ce projet stipulait que le polymorphisme d'expression de la caséine kappa bovine, observable chez certaines vaches hétérozygotes AB pour ce gène, n'était pas affecté par le stade de lactation et qu'il pouvait affecter la composition du lait. Ce polymorphisme avait été observé par différents groupes de recherche dont le nôtre (Robitaille et Petitclerc, 1998, 2000; Debeljak et al., 2000). La contribution de notre groupe de recherche était de démontrer que ce que l'on définit comme étant l'allèle A, était en fait un groupe hétérogène constitué d'un type d'allèle A exprimé de façon similaire à l'allèle B, et d'un autre exprimé de façon différente. Ces observations ont, dans un premier temps, expliqué pourquoi il était si difficile de faire ressortir un effet positif du variant B lors des nombreuses études effectuées sur le sujet. Elles ont aussi permis d'approfondir l'étude de l'expression différentielle du gène de la caséine  $\kappa$ .

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons entrepris une étude sur une lactation complète afin de doser l'expression du gène de la caséine  $\kappa$  chez des vaches hétérozygotes AB et de déterminer la composition du lait de ces dernières. Nos travaux ont permis de démontrer que le polymorphisme n'est effectivement pas affecté par le stade de lactation. Par contre, nous n'avons pas pu démontrer que ce phénomène d'expression différentielle affectait la composition du lait de façon significative. Nous espérons croire que si la comparaison de deux groupes extrêmes avait été possible, un groupe surexprimant le gène de la caséine  $\kappa$  et un groupe le sous exprimant, les résultats auraient été plus probants.



Malgré le fait que le gène de la caséine kappa ait été séquencé et que l'on ait récemment découvert plusieurs nouvelles mutations entre les allèles A et B de cette dernière (Robitaille et al., 2002), la cause de l'expression différentielle reste encore inconnue. Une attention plus particulière devrait être portée au niveau du promoteur des gènes codant pour les allèles A et B de la caséine kappa. Une mutation située près d'un site de reconnaissance d'un facteur de transcription dans la séquence du gène exprimé de façon non optimale, pourrait sans doute expliquer le polymorphisme d'expression. Il serait aussi intéressant de développer une nouvelle méthode pour « génotyper » les individus au niveau de leur expression. La technique de SSCP est longue et fastidieuse. De plus, le nombre d'échantillons pouvant être analysés sur un gel est limité. La méthode de PCR en temps réel semble une voie tout à fait indiquée pour ces études. L'emploi de cette méthode permettrait de sauver beaucoup de temps car la récolte des données se fait aussi en même temps que la réaction de PCR. Cela constitue un avantage certain lorsque l'on considère le délai occasionné par la migration des échantillons, l'exposition et le développement des films d'autoradiographie avec la technique de SSCP. Le nombre d'échantillon pourrait aussi être augmenté de façon non négligeable puisque les expériences peuvent être exécutées dans des microplaques de 96 puits.

Plusieurs facteurs peuvent avoir des répercussions au niveau de la composition du lait. L'influence des différents génotypes de la  $\beta$ -lactoglobuline et de la caséine  $\beta$ , entre autres, rendent l'analyse de l'effet résultant de l'expression différentielle des allèles de la caséine kappa plus ardue. Leurs effets peuvent être cumulatifs ou encore opposés, selon leur génotype respectif, masquant ainsi la véritable contribution du facteur que nous voulons étudier. Il nous était impossible de prendre en considération tous les haplotypes générés par l'expression différentielle des allèles de la caséine kappa, la  $\beta$ -lactoglobuline

et la caséine  $\beta$ . Le nombre d'individus requis pour que l'étude possède une certaine valeur statistique aurait de loin dépassé le nombre d'animaux disponibles dans le troupeau de Lennoxville.

Les résultats obtenus dans cette étude ne peuvent pour l'instant justifier l'emploi de la caséine kappa comme marqueur génétique. Cependant, des études menées sur une plus grande population, à l'aide d'une technique comme le PCR en temps réel, pourraient mettre en lumière l'effet directement relié au phénomène de l'expression différentielle. L'augmentation du nombre d'animaux donnerait alors plus de poids à l'analyse statistique et pourrait sans doute pallier aux nombreuses interactions causées par les génotypes de la  $\beta$ -lactoglobuline et de la caséine  $\beta$ . Ce projet de recherche procure de plus une piste intéressante en ce qui a trait au suivi de l'expression des ARNm codés par des gènes exprimés au niveau de la glande mammaire au cours d'une lactation. Nous avons en effet pu prouver que l'expression différentielle était maintenue pendant toute la lactation. La méthodologie utilisant les cellules somatiques retrouvées dans le lait pourrait être utilisée pour étudier la modulation d'autres gènes associés de près ou de loin aux variations de production de lait au cours d'une lactation.

## RÉFÉRENCES

ADCOCK, M. 2001. Glucocorticoid-regulated transcription factors. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 14: 211-219

ALEXANDER, L.J., A.F. STEWART, A.G. MACKINLAY, T.V. KAPELINSKAYA, T.M. TKACH, S.I. GORODETSKY. 1988. Isolation and characterization of the bovine  $\kappa$ -casein gene. *Eur. J. Biochem.*, 178: 395-401

ALI, S., S. ALI. 1998. Prolactin receptor regulates Stat5 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation by two separate pathways. *J. Biol. Chem.*, 273:7709- 7716

ANDERSON, M., A.T. ANDREWS. 1977. Progressive changes in individual milk protein concentrations associated with high somatic cell counts. *J. Dairy Res.*, 44: 223-235

AOKI, N., T. MATSUDA. 2000. A cytosolic protein-tyrosine phosphatase PTP1B specifically dephosphorylates and deactivates prolactin-activated Stat5a and Stat5b. *J. Biol. Chem.*, 275: 39718- 39726

ASHOOR, S.H., A. SAIR, N.F. OLSON, T. RICHARDSON. 1971. Use of papain superpolymer to elucidate the structure of bovine casein micelles. *Biochim Biophys Acta*, 229: 423-430

AULDIST, M.J., S. COATS, B.J. SUTHERLAND, J.J. MAYES, G.H. MCDOWELL, G. ROGERS. 1996. Effects of somatic cell counts and stage of lactation on raw milk composition and the yield and the quality of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, 63:269-280

AZAM, M., H. ERDJUMENT-BROMAGE, B.L. KREIDER, M. XIA, F. QUELLE, R. BASU, C. SARIS, P. TEMPST, J.N. IHLE, C. SCHINDLER. 1995. Interleukin-3 signals through multiple isoforms of Stat5. *EMBO J.*, 14: 1402- 1411

BALLOU, L.U., M. PASQUINI, R.D. BREMEL, T. EVERSON, D. SOMMER. 1995. Factors affecting herd milk composition and milk plasmin at four levels of somatic cell counts. *J. Dairy Sci.*, 78: 2186-2195

BAUMRUCKER, C.R., B.H. STEMBERGER. 1989. Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate DNA synthesis in bovine mammary tissue in vitro. *J. Anim. Sci.*, 67: 3503-3514

BOBE, G., D.C. BEITZ, A.E. FREEMAN, G.L. LINDBERG. 1999. Effects of milk protein genotypes on milk protein composition and its genetic parameter estimates. *J. Dairy Sci.*, 82: 2797-2804

BOVENHUIS, H., J.A.M. VAN ARENDOK, S. KORVER. 1992. Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits. *J. Dairy Sci.*, 75: 2549-2559

BREW, K., J.A. GROBLER. 1992.  $\alpha$ -lactalbumin, Dans Advanced Dairy chemistry, Vol. 1, ed., P.F. Fox, London: Elsevier, 780 pages

BRIGNON, G., M.F. MAHÉ, F. GROSCLAUDE, B. RIBADEAU-DUMAS. 1989. Sequence of caprine alpha s1-casein and characterization of those of its genetic variants which are synthesized at a high level, alpha s1-CnA, B and C. Prot. Seq. Data Anal., 3: 181-188

BRIGNON, G., M.F. MAHÉ, B. RIBADEAU-DUMAS, J.C. VILOTTE, F. GROSCLAUDE. 1990. Two of the three genetic variants of goat alpha S1-casein which are synthesized at a reduced level have an internal deletion possibly due to altered RNA splicing. Eur. J. Biochem., 193: 237-241

BURCZYNSKI, F.J., J.B. MORAN, Z.S. CAI, E.L. FORKER. 1990.  $\beta$ -lactoglobulin enhances the uptake of free palmitate by hepatocyte monolayers: the relative importance of diffusion and facilitated dissociation. Can. J. Physiol. Pharmacol., 68: 201-206

CELLA, N., B. GRONER, N.E. HYNES. 1998. Characterization of Stat5a and Stat5b homodimers and heterodimers and their association with the glucocorticoid receptor in mammary cells. Mol. Cell. Biol., 18: 1783-1792

CHILLIARD, Y., J.-J. COLLEAU, C. DISENHAUS, C. LERONDELLE, C. MOUCHET, A. PARIS. 1998. L'hormone de croissance recombinante : intérêt et risques potentiels de son utilisation pour la production laitière bovine. Prod. Anim., 11: 15-32.

CHEN, L.H., H.B. SADOWSKI, R.A. HOHANSKI, L.H. WANG. 1997. Stat5 is a physiological substrate of the insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 2295-2300

CHOUNG, J.-J., D.G. CHAMBERLAIN. 1992. Protein nutrition of dairy cows receiving grass silage diets. Effects on silage intake and milk production of postruminal supplements of casein or soya-protein isolate and the effects of intravenous infusions of a mixture of methionine, phenylalanine and tryptophan. *J. Sci. Food Agric.*, 58 : 307-314

COHICK, W.S.. 1998. Role of the insulin-like growth factors and their binding proteins in lactation. *J. Dairy Sci.*, 81: 1769-1777

COULON, J.B., B. RÉMOND. 1991. Variations in milk output and milk protein content in response to the level of energy supply in the dairy cow : a review. *Livest. Prod. Sci.*, 29 : 31-47

COULON, J.-B., C. HURTAUD, B. RÉMOND, R. VÉRITÉ. 1998a. Facteurs de variation de la proportion de caséines dans le lait de vache. *Prod. Anim.*, 11: 299-310

COULON, J.-B., C. HURTAUD, B. RÉMOND, R. VÉRITÉ. 1998b. Factors contributing to the variation in the proportion of casein in cow's milk true protein : a review of recent INRA experiments. *J. Dairy Res.*, 65: 375-387

CREAMER, L.K., J.E. PLOWMAN, M.J. LIDDELL, M.H. SMITH, J.P. HILL. 1998. Micelle stability:  $\kappa$ -casein structure and function. *J. Dairy Sci.*, 81: 3004-3012

DAS, R., B.K. VONDERHAAR. 1995. Transduction of prolactin's growth signal through both long and short forms of the prolactin receptor. *Mol. Endocrinol.*, 9: 1750-1759

DAVIES, D.T. A.J.R. LAW. 1983. Variation in the protein composition of bovine casein micelles and serum casein in relation to micellar size and milk temperature. *J. Dairy Res.*, 50: 67-75

DE PABLO, F., J. ROTH. 1990. Endocrinization of the early embryo : an emerging role for hormones and hormone-like factors. *Trends Biochem. Sci.*, 15: 339-342

DONNELLY, J.W. G.P. MCNEILL, W.BUCHEIM, T.C.A MCGANN. 1984. A comprehensive study of the relationship between size and protein composition in natural bovine casein micelles. *Biochim Biophys Acta*, 789: 136-143

DOPPLER, S.P., B. GRONER, R.K. BALL. 1989. Prolactin and glucocorticoid hormones synergistically induce expression of transfected rat  $\beta$ -casein gene promoter constructs in a mammary epithelial cell line. *Proc. Nat. Aca. Sci. USA*, 86: 104-108

EDWARDS, G.M. F.H. WILFORD, X. LIU, L. HENNIGHAUSEN, J. DJIANE, C. STREULI. 1998. Regulation of mammary differentiation by extracellular matrix involves protein-tyrosine phosphatases. *J. Biochem.*, 273: 9495- 9500

FELDHOF, R.C., T.JR. PETERS. 1975. Fragments of bovine serum albumin produced by limited proteolysis. Isolation and characterization of peptic fragments. *Biochemistry*, 14: 4508-4514

FIELDER, P.J., G. THORDARSON, A. ENGLISH, R.G. ROSENFELD, F. TALAMANTES. 1992. Expression of a lactogen-dependent insulin-like growth factor-binding protein in cultured mouse mammary epithelial cells. *Endocrinology*, 131: 261-267

FOLCH, J.M., P. DOVC, J.F. MEDRANO. 1999. Differential expression of bovine beta-lactoglobulin A and B promoter variants in transiently transfected HC11 cells. *J. Dairy Res.*, 66:537-544

FOX, P.F., A. FLYNN. 1992. Biological properties of milk proteins, Dans *Advanced Dairy Chemistry*, Vol. 1: Proteins, ed., P.F. Fox, London: Elsevier, 780 pages

GALA, R.R.. 1991. Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 198: 513-527

GAYE, P., J.P. GAUTRON, J.C. MERCIER, G. HAZÉ. 1977. Amino terminal sequences of the precursors of ovine caseins. *Biochem. Bioph. Res. Comm.*, 79: 903-911

GINGER, M.R., M.R. GRIGOR. 1999. Comparative aspects of milk caseins, *Comp. Biochem Phys. B.*, 124: 133-145



GLIMM, D.R., V.E. BARACOS, J.J. KENNELLY. 1990. Molecular evidence for the presence of growth hormone receptors in the bovine mammary gland. J. Endocrinol., 126: R5-R8

GLIMM, D.R., V.E. BARACOS, J.J. KENNELLY. 1992. Northern and in situ hybridization analyses of the effects of somatotropin on bovine mammary gene expression. J. Dairy Sci., 75: 2687-2705

GRAM, R., G. WEISS, J. BUCHBERGER, F. PIRCHNER. 1989. Different rates of synthesis of whey protein and casein by alleles of the  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ s1-casein locus in cattle. Gen. Select. Evol., 21: 547-554

GRINARI, J.M., M.A. MCGUIRE, D.A. DWYER, D.E. BAUMAN, D.M. BARBANO, W.A. HOUSE. 1997. The role of insulin in the regulation of milk protein synthesis in dairy cows. J. Dairy Sci., 80: 2361-2371

GROSCLAUDE, F., P. JOUDRIER, M.F. MAHÉ. 1978. Polymorphisme de la caséine as2 bovine: étroite liaison du *locus* as2-Cn avec les *loci* as1-Cn, b-Cn et k-Cn; mise en évidence d'une délétion dans le variant as2-CnD. Ann. Genet. Sel. Anim., 10: 313-327

GROSCLAUDE, F. 1988. Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. Relations avec la quantité, la composition et les aptitudes fromagères du lait. Prod. Anim., 1: 5-17

GROSCLAUDE, F., G. ROCORDEAU, P. MARTIN, F. REMEUF, L. VASSAL, J. BOUILLON. 1994. Du gène au fromage : le polymorphisme de la caséine  $\alpha$ S1 caprine, ses effets, son évolution. INRA Prod. Anim., 7-1: 3-19

HENNINGHAUSEN, L., G.W. ROBINSON, K.-U. WAGNER, X. LIU. 1997. Prolactin signaling in mammary gland development. J. Biol. Chem., 272: 7567- 7569

HOLT, C., D.S. HORNE. 1996. The hairy casein micelle: evolution of the concept and its implications for dairy technology. Neth. Milk Dairy J., 50: 85-111

HORISBERGER, M., M. VONLANTHEN. 1980. Localization of glycosylated  $\kappa$ -casein in bovine casein micelles by lectin-labelled gold granules. J. Dairy Res., 47: 185-191

HOBBS, A.A., D.A. RICHARDS, D.J. KESSLER, J.M. ROSEN. 1982. Complex hormonal regulation of rat casein gene expression. J. Biol. Chem., 257: 3598-3605

HURLEY, W.L. 1989. Mammary gland function during involution. J. Dairy Sci., 72: 1637-46

IKONEN, T., M. OJALA, O. RUOTTINEN. 1997. Effects of  $\beta$ - and  $\kappa$ -casein genotypes on first lactation milk production traits in finnish Ayrshire cows. Dans Milk protein polymorphism, International Dairy Federation, Bruxelles, Belgique, p. 47-53

JAKOB, E., Z. PUHAN. 1995. Implications of genetic polymorphism of milk proteins on production and processing of milk. Bulletin of international dairy federation. 304: 2-25

JAMMES, H., C. DISENHAUS, V. OURIET, C. KAYSER, M.C. POSTEL-VINAY, J. DJIANE. 1996. Growth hormone-binding protein in the goat: characterization, evolution under exogenous growth hormone treatment, and correlation with liver growth hormone receptor levels. Domest. Anim. Endocrinol., 13: 477-489.

JANEWAY, C.A., P. TRAVERS. 1997. Immunobiologie. 2e edition. De Boek & Larcier s.a. Département De Boek Université, Bruxelles, 582 pages

JENNESS, R. 1988. Composition of milk. Dans: Fundamentals of Dairy Chemistry. 3<sup>rd</sup> ed. N. P. Wong, R. Jenness, M. Kenney, and E.H. Marth (Eds.). New York: Van Nostrand Reinhold Co., 779 pages

JENSEN, G.J., A.M. FERRIS, C.J. LAMMI-KEEFE. 1991. The composition of milk fat. J. Dairy Sci., 74: 3228-3243

JENSEN, G.J.. 1995. Handbook of milk composition. Academic press, San Diego, 921 pages

JOLLES, J., A.M. FIAT, F. SCHOENTGEN, C. ALAIS, P. JOLLES. 1974. The amino acid sequence of sheep kappa A-casein. II. Sequence studies concerning the kappa A-caseinoglycopeptide and establishment of the complete primary structure of the protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 365: 335-343

JONES, W.K., L.-Y. YU-LEE, S.M. CLIFT, T.L. BROWN, J.M. ROSEN. 1985. The rat casein multigene family: Fine structure and evolution of the  $\beta$ -casein gene. *J. Biol. Chem.*, 260: 7042-7050

KAMINSKI, S.. 1996. Bovine kappa-casein (CASK) gene – molecular nature and application in dairy cattle breeding. *J. Appl. Genet.*, 37: 179-196

KELLY, P.A., J. DJIANE, M.C. POSTEL-VINAY, M. EDERY. 1991. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocrinol. Rev.*, 3: 235-251

KEYS, J.E., J. DJIANE. 1988. Prolactin and growth hormone binding in mammary and liver tissue of lactating cows. *J. Receptor Res.*, 5: 731-750

KOPROWSKI, J.A., H.A. TUCKER. 1973a. Serum prolactin during various physiological states and its relationship to milk production in the bovine. *Endocrinol.*, 92: 1480-1487

KOPROWSKI, J.A., H.A. TUCKER. 1973b. Bovine serum growth hormone, corticoids and insulin during lactation. *Endocrinol.*, 93: 645-651

KUDO, S., S. IWATA, M. MADA. 1979. An electron microscopic study of the location of  $\kappa$ -casein in casein micelles by periodic acid-silver methenamine staining. J. Dairy Sci., 62: 916-920

LECHNER, J., T. WELTE, J.K. TOMASI, P. BRUNO, C. CAIRNS, J.A. GUSTAFSSON, W. DOPPLER. 1997. Promoter-dependent synergy between glucocorticoid receptor and Stat5 in the activation of  $\beta$ -casein gene transcription. J. Biol. Chem., 272: 20954-20960

LITTELL, R.C., G.A. MILLIKEN, W.W. SROUP, R.D. WOLFINGER, N.C. CARY. 1996. SAS System for Mixed Models. SAS Institute Inc., 633pp.

LIU, X., G.W. ROBINSON, L. HENNINGHAUSEN. 1996. Activation of Stat5a and Stat5b by tyrosine phosphorylation is tightly linked to mammary gland differentiation. Mol. Endocrinol., 10: 1496- 1506

LIU, X., G.W. ROBINSON, K.-U. WAGNER, L. GARRETT, A. WYNshaw-BORIS, L. HENNINGHAUSEN. 1997. Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis, Gene Dev., 11: 179-186

LUNDÉN, A., M. NILSSON, L. JANSON. 1997. Marked effect of  $\beta$ -lactoglobulin polymorphism on the ration of casein to total protein in milk. J. Dairy Sci., 80: 2996-3005

MARTIN, P. 1993. Polymorphisme génétique des lactoprotéines caprines. Lait, 73: 511-532

MARTIN, P. 1996. La composition du lait de chèvre : ses particularités. Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre. Ed. INRA, Paris. Colloques n° 81: 27-49

MARTIN, P., C. LEROUX. 2000. Le gène caprin spécifiant la caséine  $\alpha S1$  : un suspect tout désigné aux effets aussi multiples qu'inattendus. INRA Prod. Anim., Oct. 2000 numéro hors série « Génétique moléculaire : principes et applications aux populations animales ». 125-132

MCDOWELL, G.H., I.C. HART, A.C. KIRBY. 1987. Local intra-arterial infusion of growth hormone into the mammary glands of sheep and goats: effects on milk yield and composition, plasma hormones and metabolites. Aust. J. Biol. Sci., 40: 181-189

MCGANN, T.C.A., W.J. DONNELLY, R.D. KEARNY, W.BUCHEIM. 1980. Composition and size distribution of bovine casein micelles. Biochim. Biophys. Acta, 630: 261-270

MERCIER, J.C., J.L. VILOTTE. 1993. Structure and function of milk protein genes. J. Dairy Sci., 76: 3079-3098

MOHR, U., D. KOCZAN, D. LINDER, G. HOBOM, G. ERHARDT. 1994. A single point mutation results in A allele-specific exon skipping in the bovine alpha S1-casein mRNA. *Gene*, 143: 187-192

MORR, C.V.. 1967. Effect of oxalate and urea upon ultracentrifugation properties of raw and heated skim-milk casein micelles. *J. Dairy Sci.*, 50: 1744-1751

MUI, A.L.F., H. WAKAO, A.M. O'FARRELL, N. HARANDA, A. MIYAJIMA. 1995. Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs. *EMBO J.*, 14: 1166- 1175

MUSCHLER, J., A. LOCHTER, C.D. ROSKELLEY, P. YURCHENCO, M.J. BISSELL. 1999. Division of labor among the  $\alpha_6\beta_4$  integrin,  $\beta_1$  integrin, and an E3 laminin receptor to signal morphogenesis and  $\beta$ -casein expression in mammary epithelial cells. *Mol. Biol. Cell*, 10: 2817- 2828

NG-KWAI-HANG, K.F., J.F. HAYES, J.E. MOXLEY, H.G. MONARDES. 1986. Relationship between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.*, 69: 22-26

NG-KWAI-HANG, K.F., J.F. HAYES, J.E. MOXLEY, H.G. MONARDES. 1987. Variation in milk protein concentration associated with genetic polymorphism and environmental factors. *J. Dairy Sci.*, 70: 563-570

OJALA, M., T.R. FAMULA, J.F. MEDRANO. 1997. Effects of milk protein genotypes on the variation for milk production traits of Holstein and Jersey cows in California. J. Dairy Sci., 80: 1776-1785

OLIVIER, S.P., L.M., SORDILLO. 1989. Approaches to the manipulation of mammary involution. J. Dairy Sci., 72:1647-1664

PEPPER, L.. 1972. Casein interactions as studied by gel chromatography and ultracentrifugation. Biochim. Biophys. Acta, 278: 147-154

PÉREZ, M.J., C. LEROUX, A.S. BONASTRE, P. MARTIN. 1994. Occurrence of a LINE sequence in the 3' UTR of the goat alpha S1-casein E encoding allele associated with reduced protein synthesis level. Gene, 147: 179-187

PÉREZ, M.D., M. CALVO. 1995. Interaction of b-lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein : a review. J. Dairy Sci., 78: 978-988

PERMYAKOV, E.A., L.J. BERLINER. 2000.  $\alpha$ -lactalbumin : Structure and function. FEBS Lett., 473: 269-274



PROSSER, C.G., L. SANKARAN, L. HENNINGHAUSEN, Y.J. TOPPER. 1987. Comparison of the roles of insulin and insulin-like growth factor 1 in casein gene expression and in the development of  $\alpha$ -lactalbumin and glucose transport activities in the mouse mammary epithelial cell. *Endocrinology*, 120: 1411-1416

PROSSER, C.G., C. ROYLE, I.R. FLEET, T.B. MEPHAM. 1991. The galactopoietic effect of bovine growth hormone in goats is associated with increased concentrations of insulin-like growth factor-I in milk and mammary tissue, *J. Endocrinol.*, 128: 457-463

PROSSER, C.G., S.-A. TURNER, R.D. MCLAREN, B. LANGLEY, P.J. L'HUILIER, P. MOLAN, M.J. AULDIST. 2000. Milk whey protein concentration and mRNA associated with  $\beta$ -lactoglobulin phenotype. *J. Dairy Res.*, 67: 287-293

RIJNKELS, M., D.A. WHEELER, H.A. DE BOER, F.R. PIEPER. 1997a. Structure and expression of the mouse casein gene locus. *Mamm. Genome*, 8: 9-15

RIJNKELS, M., P.M. KOOIMAN, H.A. DE BOER, F.R. PIEPER. 1997b. Organization of the bovine casein locus, *Mamm. Genome*, 8: 148-152

RIJNKELS, M., E. MEERSHOEK, H.A. DE BOER, F.R. PIEPER. 1997c. Physical map and localization of the human casein gene locus, *Mamm. Genome*, 8: 285-286

RIPPERGER, J.A., S. FRITZ, K. RICHTER, G.M. HOCKE, F. LOTTSPREICH, G.H. FEY. 1995. Transcription factors Stat3 and Stat5b are present in rat liver nuclei late in an acute phase response and bind interleukin-6 response elements. J. Biol. Chem. 270: 29998- 30006

ROBITAILLE, G., K.-F. NG-KWAI-HANG, H.G. MONARDES. 1991. Variation in the N-acetyl neuraminic acid content of bovine  $\kappa$ -casein, J. Dairy Res., 58: 107-114

ROBITAILLE, G.. 1995. Influence of  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin genetic variants on the heat stability of milk. J. Dairy Res., 62: 593-600

ROBITAILLE, G., D. PETITCLERC. 1998. Differential allele-specific transcription of  $\kappa$ -casein gene in Holstein cows. J. Dairy Sci., 81 (Suppl.1): 377

ROBITAILLE, G., D. PETITCLERC. 2000. Expression polymorphism of  $\kappa$ -casein gene in Holstein cows. J. Dairy Sci., 67: 107-111

ROBITAILLE, G., M. BRITTEN, J. MORISSET, D. PETITCLERC. 2002. Quantitative analysis of  $\beta$ -lactoglobulin A and B variants in milk of cows  $\beta$ -lactoglobulin AB throughout lactation. J. Dairy Res., 69: 651-654

ROBITAILLE, G., M. BRITTEN, J. MORISSET, D. PETITCLERC. 2002. Polymorphism within the kappa-casein gene. J. Dairy Sci., 85 (Supp. 1): 377

ROSEN, J.M., S.L. WYSZOMIERSKI, D. HADSELL. 1999. Regulation of milk protein gene expression. *Annu. Rev. Nutr.*, 19: 407-436

ROSHELLEY, C.D., P.Y. DESPREZ. M.J. BISSELL. 1994. Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction. *Proc. Nat. Aca. Sci. USA*, 91: 12378-12382

REDDY, B.M. A.A. KARANDE, P.R. ADIGA. 1992. A common epitope of beta-lactoglobulin and serum retinol-binding proteins: elucidation of its core sequence using synthetic peptides. *Mol. Immunol.*, 29: 511-516

SAITO, H., T. OKA. 1996. Hormonally regulated double- and single-stranded DNA-binding complexes involved in the mouse  $\beta$ -casein gene transcription. *J. Biol. Chem.*, 271: 8911- 8918

SAWYER, L.. 1993. The secondary structure of milk proteins and their biological function. *J. Dairy Sci.*, 10: 65-72

SHARMA, B.K., M.J. VENDEHAAR, N.K. AMES. 1994. Expression of insulin-like growth factor I in cows at different stages of lactation and in late lactation cows treated with somatotropin. *J. Dairy Sci.*, 77: 2232-2241

SLATTERY, C.W., R. EVARD. 1973. A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition. *Biochim. Biophys. Acta*, 317: 529-538

SLATTERY, C.W.. 1976. Review: Casein micelle structure; An examination of models. J. Dairy Sci., 59: 1547-1556

SNYDER, M., M. HUNKAPILLER, D. YUEN, D. SILVERT, J. FRISTROM, N. DAVIDSON. 1982. Cuticle protein genes of *Drosophila* : structure, organization and evolution of four clustered genes. Cell, 29: 1027-1040

STÖCKLIN, E., M. WISSLER, F. GOUILLEUX, B. GRONER. 1996. Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. Nature, 383: 726-728

STREULI, C.H., N. BAILEY, M.J. BISSELL. 1991. Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. J. Cell Biol., 115: 1383-1395

STREULI, C.H., C. SCHMIDHAUSER, N. BAILEY, P. YURCHENCO, A.P.N. SKUBITZ, C. ROSKELLEY, M.J. BISSELL. 1995. Laminin mediates tissue-specific gene expression in mammary epithelia. J. Cell Biol., 129: 591-603

SWAISGOOD, H.E. 1992. Chemistry of the caseins, Dans Advanced Dairy chemistry, Vol. 1, ed., P.F. Fox, London: Elsevier, 780 pages

TAULIER, N., T.V. CHALIKIAN. 2001. Characterization of pH-induced transitions of  $\beta$ -lactoglobulin: ultrasonic, densimetric, and spectroscopic studies. J. Mol. Biol., 314: 873-889

THÉPOT, D., L.M. HOUEBINE. 1999. The transcriptional regulation of milk protein genes. AgBiotechNet®. 1 ; ABN 021: 1-9

UDY, G.B., R.P. TOWERS, R.G. SNELL, R.J. WILKINS, S.-H. PARK, P.A. RAM, D.J. WAXMAN, H.W. DAVEY. 1997. Requirement of Stat5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. Proc. Nat. Aca. Sci. USA, 94: 7239-7244

VAN BERCKEL, P.H.C., M.M. WELLING, M. GEERTS, H.A. VAN VEEN, B. RAVENSBURGEN, M. SALAHEDDINE, E.K.J. PAUWELS, F. PIEPER, J.H. NUIJENS, P.H. NIBBERING. 2002. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. Nat. Biotechnol., 20: 484-487

VISSER, S., C.J. SLANGEN, H.S. ROLLEMA. 1991. Phenotyping of bovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J. Chromat., 548: 361-370

VONDERHAAR, B.K., S.E. ZISKA. 1989. Hormonal regulation of milk protein gene expression. Annu. Rev. Physiol., 51: 641- 652

VREEMAN, H.J., P. BOTH, J.A. BRINKHUIS, C. VAN DER SPEK. 1977. Purification and some physiochemical properties of bovine  $\kappa$ -casein. Biochim. Biophys. Acta, 491: 93-103

WALSH, C.D., T.P. GUINEE, D. HARRINGTON, R. MEHRA, J. MURPHY, R.J. FITZGERALD. 1998. Cheesemaking, compositional and functional characteristics of low-moisture part-skim Mozzarella cheese from bovine milks containing  $\kappa$ -casein AA, AB or BB genetic variants. *J. Dairy Res.*, 65: 307-315

WATSON, C.J.. 2001. Stat transcription factors in mammary gland development and tumorigenesis. *J. Mammary Gland Biol.*, 6: 115- 127

WAUGH, D.F., L.K. CREAMER, C.W. SLATTERY, G.W. DRESDNER. 1970. Core polymers of casein micelles. *Biochemistry*, 9: 786-795

WELTE, T., S. PHILIPP, C. CAIRNS, J.A. GUSTAFSSON, W. DOPPLER. 1993. Glucocorticoid receptor binding sites in the promoter region of milk protein genes. *J. Steroid Biochem.*, 47: 75-81

WILKINS, R.J., H.W. DAWER, T.T. WHEELER, C.A. FORD. 1995. Differential expression of  $\beta$ -lactoglobulin alleles A and B in dairy cattle. Dans *Intercellular signalling in the mammary gland*. Wilde C.J. et al. Éditeurs, Plenum Press, New York, 310 pages

XUE, Y., J.N. LIU, Z. SUN, Z. MA, C. WU, D. ZHU. 2001. Alpha-lactalbumin mutant acting as lysozyme. *Proteins*: 4217-4222